



Universidade Presbiteriana Mackenzie
Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde, Curso de Ciências Biológicas



JULIA MATIAS CHISHMAN

AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO SEXUAL E PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM
CAMUNDONGOS MACHOS COM HIPOPITUITARISMO CONGÊNITO

São Paulo, 2024



Universidade Presbiteriana Mackenzie
Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde, Curso de Ciências Biológicas



JULIA MATIAS CHISHMAN

AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO SEXUAL E PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM
CAMUNDONGOS MACHOS COM HIPOPITUITARISMO CONGÊNITO

Trabalho de Conclusão de Curso
para a obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas orientado
pela Profa. Dra. Luciani Renata
Silveira de Carvalho e coorientado
pela Profa. Dra. Esther Lopes Ricci
Adari Camargo

São Paulo, 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, às minhas orientadoras, Profa. Dra. Luciani Renata Silveira de Carvalho e Profa. Dra. Esther Lopes Ricci Adari Camargo, pela valiosa orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Um agradecimento especial à Ms. Bruna Viscardi de Azevedo Klink, pela dedicação, paciência e conselhos ao longo de toda a realização deste estudo.

A todos os amigos, colegas e docentes do curso de Ciências Biológicas da Universidade Presbiteriana Mackenzie, pelos últimos e inesquecíveis quatro anos.

A todos os colegas do LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em especial aos membros do grupo de pesquisa em hipopituitarismo congênito.

Aos colegas do LIM/05, em especial Mariana Veras, Ana Clara Bastos e Dunia Waked, pela paciência e ajuda durante as histologias.

Um agradecimento especial aos meus pais, Cláudio e Elizabeth, pelo apoio incondicional, tanto emocional quanto financeiro, e por sempre acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste estudo de alguma forma. Dedico também este trabalho aos animais que deram suas vidas para que esta pesquisa fosse possível; suas vidas jamais serão esquecidas e serão eternizadas por meio desta pesquisa.

RESUMO

Introdução: A glândula hipofisária desempenha um papel essencial na produção e secreção hormonal, dependendo de fatores de transcrição para sua formação embrionária. Entre esses fatores está o gene *Prop1*, responsável pela diferenciação terminal das linhagens hipofisárias produtoras de hormônios. Alterações no *Prop1* estão associadas ao hipopituitarismo congênito, condição que compromete crescimento, desenvolvimento sexual e reprodutivo. Embora a linhagem Ames tenha sido inicialmente considerada infértil, tratamentos com levotiroxina e GH restauraram a fertilidade e permitiram a observação de maturação sexual espontânea. **Objetivo:** Caracterizar a prevalência do fenômeno de maturação sexual espontânea em camundongos machos pertencentes a linhagem Ames mantidos na FMUSP. **Materiais e Métodos:** Camundongos normais e mutantes da linhagem Ames, com mutação no gene *Prop1*, foram monitorados a partir dos 21 dias para sinais de maturação sexual, como descida testicular e abertura prepucial. Análises histológicas testiculares foram realizadas para avaliar túbulos seminíferos e presença de células germinativas maduras. **Resultados:** Os camundongos mutantes apresentaram maturação sexual espontânea tardia em relação aos controles. Enquanto os controles alcançaram a maturidade aos $25 \pm 2,49$ dias, os mutantes demoraram até $60 \pm 11,70$ dias ($p = 0,0002$). O peso médio no momento da maturação também foi significativamente menor nos mutantes ($6,33 \pm 0,31$ g) comparado aos controles ($12,02 \pm 0,73$ g, $p < 0,0001$). Aos 90 dias, os mutantes mantiveram menor peso corporal ($6,88 \pm 0,59$ g vs. $23,58 \pm 0,89$ g) e comprimento naso-anal ($5,7 \pm 0,53$ cm vs. $7,7 \pm 0,53$ cm, $p = 0,0098$). A análise histológica revelou túbulos seminíferos desorganizados nos mutantes, com escores de Johnsen significativamente mais baixos ($6,07 \pm 0,42$ e $9,33 \pm 0,27$, $p = 0,0009$). A análise dos túbulos seminíferos indicam estágios variados de desenvolvimento nos Mutantes. Apesar dessas alterações, todos os mutantes alcançaram maturação sexual completa. **Conclusão:** Camundongos mutantes apresentaram atraso na maturação sexual, diferenças corporais e reprodutivas, e espermatogênese heterogênea. Apesar de alterações nos túbulos seminíferos e desenvolvimento testicular, todos atingiram maturação completa.

Palavras-chave: Maturação sexual; Hipopituitarismo Congênito; Epigenética.

ABSTRACT

Introduction: The pituitary gland plays a crucial role in hormonal production and secretion, relying on transcription factors for its embryonic development. Among these is the *Prop1* gene, essential for the terminal differentiation of hormone-producing pituitary lineages. *Prop1* mutations are associated with congenital hypopituitarism, a condition that impairs growth, sexual, and reproductive development. Although the Ames lineage was initially considered infertile, treatments with levothyroxine and GH restored fertility and allowed observation of spontaneous sexual maturation. **Objective:** To characterize the prevalence of spontaneous sexual maturation in male Ames mice maintained at FMUSP. **Materials and Methods:** Normal and Ames mutant mice with a *Prop1* gene mutation were monitored from 21 days of age for signs of sexual maturation, such as testicular descent and preputial opening. Testicular histological analyses were performed to evaluate seminiferous tubules and the presence of mature germ cells. **Results:** Mutant mice exhibited delayed spontaneous sexual maturation compared to controls. While controls matured at 25 ± 2.49 days, mutants required up to 60 ± 11.70 days ($p = 0.0002$). Mean weight at maturation was significantly lower in mutants (6.33 ± 0.31 g) compared to controls (12.02 ± 0.73 g, $p < 0.0001$). At 90 days, mutants maintained lower body weight (6.88 ± 0.59 g vs. 23.58 ± 0.89 g) and naso-anal length (5.7 ± 0.53 cm vs. 7.7 ± 0.53 cm, $p = 0.0098$). Histological analysis revealed disorganized seminiferous tubules in mutants, with significantly lower Johnsen scores (6.07 ± 0.42 vs. 9.33 ± 0.27 , $p = 0.0009$). Seminiferous tubule analysis indicated varied developmental stages in mutants. Despite these alterations, all mutants achieved complete sexual maturation. **Conclusion:** Mutant mice exhibited delayed sexual maturation, along with differences in body and reproductive characteristics and heterogeneous spermatogenesis. Despite alterations in seminiferous tubules and testicular development, all mutants achieved complete maturation.

Keywords: Sexual maturation; Congenital Hypopituitarism; Epigenetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 GLÂNDULA HIPOFISÁRIA.....	1
1.2 HIPOPITUITARISMO CONGÊNITO.....	2
1.2.1 <i>Definição</i>	2
1.2.2 <i>Manifestações clínicas</i>	2
1.2.3 <i>Etiologia e fenótipo</i>	3
1.3 MODELO ANIMAL.....	3
1.4 DESENVOLVIMENTO SEXUAL E REPRODUTIVO.....	4
1.4.1 <i>Impacto das gonadotrofinas e andrógenos</i>	5
1.4.2 <i>Impacto de fatores ambientais</i>	6
1.5 JUSTIFICATIVA.....	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	9
3.2 DESCRIÇÃO DA LINHAGEM.....	10
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	10
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	11
3.5 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	11
3.6 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO PELO MÉTODO SANGER.....	11
3.6.1 <i>Extração de DNA</i>	11
3.6.2 <i>Amplificação do DNA por PCR</i>	12
3.6.3 <i>Reação de Sequenciamento</i>	13
3.7 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO SEXUAL EM CAMUNDONGOS MACHOS.....	13
3.8 EUTANÁSIA.....	12
3.9 COLETA DE DADOS ANTROPOMÉTRICOS.....	14
3.9.1 <i>Avaliação do peso corporal e testicular</i>	13
3.9.2 <i>Avaliação do comprimento naso-anal</i>	13
3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TECIDOS.....	15
3.11 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	16
4. RESULTADOS	16
4.1 FORMAÇÃO DE CASAIS E DADOS DE PROLE.....	16
4.2 ACOMPANHAMENTO DA MATURAÇÃO SEXUAL.....	17
4.3 DADOS ANTROPOMÉTRICOS.....	19
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	21
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	29
7. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 GLÂNDULA HIPOFISÁRIA

A glândula hipofisária está localizada na sela túrsica do osso esfenóide, e é composta por um lobo anterior (adenohipófise), lobo posterior (neurohipófise) e um lobo intermediário vestigial. A Hipófise, sob influência de fatores hipotalâmicos, é responsável por coordenar e estruturar o funcionamento das glândulas endócrinas, dentre elas a tireoide, as glândulas adrenais e as gônadas

A formação da glândula hipofisária é resultado de complexas interações entre tecidos embrionários e um amplo conjunto de fatores de transcrição, os quais desencadeiam a especialização das diferentes linhagens celulares produtoras de hormônios (PLANT; ZELEZNIK, 2015)

A organogênese da hipófise tem origem no processo de invaginação do ectoderma oral, no topo da cavidade oral presumível, o que eventualmente originará os lobos anterior e intermediário. O lobo posterior é originado a partir de um infundíbulo que se desenvolve a partir de uma invaginação descendente do neuroectoderma (DI IORGI *et al.*, 2009)

Enquanto a neurohipófise é responsável apenas pela secreção dos hormônios vasopressina e oxitocina, as células presentes no adenohipófise irão se diferenciar em cinco linhagens: Corticotrofo, responsável pela secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), somatotrofo, responsável pela secreção do hormônio do crescimento (GH), lactotrofo que secreta prolactina (PRL), tireotrofos que secretam o hormônio estimulador da tireoide (TSH), gonadotrofo, responsável pela secreção do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) (MELMED *et al.*, 2016; WATKINS-CHOW; CAMPER, 1998)

A diferenciação nas linhagens celulares secretoras de hormônios pela adenohipófise é resultado de uma cascata de vias sinalizadoras e fatores de transcrição hipofisários, que são importantes para o comprometimento das células progenitoras, diferenciação terminal das linhagens, produção e secreção dos hormônios (SCHOENMAKERS *et al.*, 2015)

A secreção hormonal adequada é fundamental para manter o equilíbrio dos sistemas endócrinos, pois os hormônios funcionam como sinais essenciais que coordenam as atividades de diferentes células e órgãos. Quando esse equilíbrio é perturbado, como ocorre em doenças como o hipopituitarismo congênito, surgem deficiências hormonais significativas. Essas falhas podem levar a sérios comprometimentos em funções essenciais do organismo, incluindo crescimento, fertilidade, regulação da glicose e resposta imunológica (DIVALL; MERJANEH, 2018)

1.2 HIPOPITUITARISMO CONGÊNITO

1.2.1 Definição

O hipopituitarismo é definido como a deficiência de 1 ou mais hormônios hipofisários seja no lobo anterior ou posterior (ROMERO; NESI-FRANÇA; RADOVICK, 2009). Quando o comprometimento é simultâneo de hormônios do lobo anterior e posterior denominamos de panhipopituitarismo. O quadro congênito dessa doença ainda representa um desafio na compreensão de suas causas.

Essa condição é considerada rara, no estudo de Jakobsen *et al.*, 2023, que procurou estimar a incidência do hipopituitarismo congênito em jovens com menos de 18 anos na Dinamarca. Foi observado que, dentro da população estudada, a incidência anual foi de 5,74 casos por milhão de habitantes, dentre os anos de 1996 a 2020, predizendo uma incidência de 1:10.000 nascidos vivos.

1.2.2 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas do hipopituitarismo são inespecíficas e se desenvolvem de maneira insidiosa. Dentre as deficiências relacionadas com hormônios da hipófise anterior, a deficiência de GH é a mais prevalente, os primeiros sinais aparecem por volta dos dois anos de idade, e incluem uma taxa de crescimento abaixo do normal e uma estrutura física menor (ROMERO; NESI-FRANÇA; RADOVICK, 2009). Além da deficiência do GH, também podem ocorrer outras deficiências de hormônios secretados pela adenohipófise, como a deficiência na secreção de gonadotrofinas, que leva ao retardo puberal (TOOGOOD; STEWART, 2008)

Atualmente, observa-se que uma porcentagem dos pacientes manifesta a doença devido à presença de variantes patogênicas (MEHTA *et al.*, 2009)

1.2.3 Etiologia e Fenótipo

Variantes em fatores de transcrição tais como *PROP1*, *POU1F1*, *HESX1*, *GLI2*, *SOX2*, *SOX3*, *LHX3*, e *LHX4* podem ser causas da deficiência congênita combinada de hormônios hipofisários em humanos (MADEIRA *et al.*, 2017), assim como diversas outras alterações genéticas em humanos já foram relacionadas com o hipopituitarismo (ROMERO; NESI-FRANÇA; RADOVICK, 2009).

Entre os fatores de transcrição previamente mencionados que contribuem para a etiologia do hipopituitarismo congênito, as alterações genéticas no gene *PROP1* são mais prevalente na literatura mundial, perfazendo 48,5% das famílias analisadas com casos familiares e 6,7% nos casos esporádicos (DE RIENZO *et al.*, 2015). Essa prevalência foi comprovada no estudo nacional publicado por Madeira *et al.* (MADEIRA *et al.*, 2017), conduzido no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, evidenciando alteração genética em 53% dos casos analisados, com 75% casos familiares e consanguíneos e 25% casos esporádicos.

O gene *PROP1*, expresso na hipófise embrionária, codifica uma proteína do tipo homeodomínio, que é necessária para ativar a expressão do fator de transcrição *POU1F1* (também conhecido como *PIT1*) (DASEN; ROSENFELD, 2001; WATKINS-CHOW; CAMPER, 1998). Embora o *PIT1* atue diretamente na determinação e diferenciação terminal das linhagens somatotrofa, tireotrofa e lactotrofa (SHENG; WESTPHAL, 1999), é o *PROP1* responsável pela diferenciação desse gene, garantindo assim o desenvolvimento adequado dessas linhagens celulares de forma indireta (ZHANG *et al.*, 2020).

1.3 MODELO ANIMAL

A compreensão dos fenótipos relacionados ao hipopituitarismo, além de processos metabólicos relacionados a maturação sexual e fertilidade, podem ser aprimoradas por meio da utilização de modelos animais transgênicos e de variações espontâneas (GAHETE; LUQUE; CASTAÑO, 2016).

Para o estudo de variantes no gene *PROP1*, um dos modelos animais utilizados é linhagem de camundongos Ames (*df/df*), descrita por Schaible e Gowen em 1961 (BARTKE, 1965). Os animais dessa linhagem possuem uma variante genética espontânea no gene *Prop1*, o que resulta na falha da expressão das linhagens do

gene *Pou1f1* dependentes (SORNISON *et al.*, 1996), apresentando um fenótipo semelhante ao observado em humanos: nanismo proporcional severo e infertilidade devido à deficiência de GH, TSH e PRL, além disso as alterações no gene *Prop1* resultam em deficiência das gonadotrofinas levando ao hipogonadismo, que resulta em baixos níveis de hormônios gonadotrofos e testosterona, o que torna essa linhagem um modelo relevante para estudos relacionados a infertilidade (QIAN *et al.*, 2022; SCHOENMAKERS *et al.*, 2015). É importante salientar que existe a possibilidade de restauração da fertilidade em camundongos Ames machos a partir do tratamento de reposição do hormônio GH e levitiroxina (BARTKE, 1965).

Em humanos, os fenótipos relacionados com a variante alélica deletéria no gene *PROP1* resultam em deficiências de GH, PRL e TSH, além de falhas nas linhagens gonadotróficas e corticotróficas (ROMERO; NESI-FRANÇA; RADOVICK, 2009). Esse quadro difere significativamente do fenótipo observado em camundongos deficientes em *PROP1*, nos quais o eixo corticotrófico se mantém funcional, com níveis elevados de ACTH e corticosterona, contrastando com a perda progressiva de função típica em humanos (NASONKIN *et al.*, 2011).

Um dos primeiros estudos que demonstrou o restauro da fertilidade em camundongos Ames, por meio da reposição hormonal, foi conduzido por Bartke, A, em 1965 (BARTKE, 1965). Nesse estudo, os camundongos foram submetidos a tratamentos hormonais ao longo de 60 dias, revelando que aqueles tratados com GH isoladamente e/ou em combinação com TSH ou tiroxina tinham a fertilidade restaurada após 40 dias.

1.4 DESENVOLVIMENTO SEXUAL E REPRODUTIVO

O desenvolvimento sexual e reprodutivo é um processo regulado por uma complexa interação de fatores internos e externos. As gonadotrofinas, como LH e FSH, juntamente com os andrógenos, desempenham um papel central na maturação das gônadas e na produção de gametas, garantindo a funcionalidade reprodutiva. Por outro lado, fatores ambientais, como o estresse, podem atuar como moduladores epigenéticos, alterando a expressão de genes essenciais e comprometendo a saúde reprodutiva. (GAHETE; LUQUE; CASTAÑO, 2016; JONES; BAYLIN, 2002; VENKEN *et al.*, 2007)

1.4.1 Impacto das Gonadotrofinas e Andrógenos

A linhagem dos gonadotrofos é responsável pela secreção dos hormônios FSH e LH,

essenciais para a produção de hormônios sexuais e gametas, além de conectarem a hipófise às gônadas (MELMED *et al.*, 2016). Indivíduos com a variante mais comum do gene *PROP1* (c.301_302delAG) apresentam função gonadotrófica prejudicada, o que resulta em manifestações como tamanho reduzido do pênis e, em alguns casos, criptorquidia em recém-nascidos do sexo masculino. Já nas manifestações tardias o desenvolvimento sexual pode ser ausente, ou atrasado e incompleto, assim como a possibilidade de infertilidade (CARVALHO *et al.*, 2022).

A puberdade em mamíferos normais, incluindo camundongos, é um processo biológico completo que envolve o desenvolvimento sexual e o crescimento acelerado, conduzindo à maturação sexual e à capacidade reprodutiva (NAVARRO, 2020)

Nos machos, os hormônios LH e FSH, estimulados pelo GnRH, são cruciais: o LH age nas células de Leydig para produção de testosterona, enquanto o FSH atua nas células de Sertoli, que suportam a espermatogênese (GAHETE; LUQUE; CASTAÑO, 2016). Andrógenos, como testosterona e diidrotestosterona (DHT), desempenham papéis não só na reprodução, mas também no desenvolvimento ósseo e muscular durante a puberdade, indicando uma via estrutural alternativa para o desenvolvimento mesmo em ausência de sinalização do GH (VENKEN *et al.*, 2007).

Nas células de Sertoli, andrógenos se ligam a receptores que regulam a espermatogênese, e estudos em camundongos com receptor de LH inativado (LuRKO) sugerem que, em certos casos, a sinalização de FSH pode compensar a falta de testosterona, permitindo a continuidade da espermatogênese (KAPRARA; HUHTANIEMI, 2018). No entanto, quando há falhas na secreção pulsátil de GnRH, como ocorre no hipogonadismo hipogonadotrófico, a produção de LH e FSH é comprometida, afetando diretamente a função gonadal (DE PAULA *et al.*, 2021). Esse quadro pode derivar de disfunções no eixo hipotalâmico-hipofisário e é influenciado por neuropeptídeos, como as kisspeptinas, que modulam a liberação de GnRH. Variantes nos receptores de kisspeptinas podem interromper a puberdade e resultar em hipogonadismo hipogonadotrófico, afetando a maturação sexual tanto em humanos quanto em modelos animais (FRAIETTA; ZYLBERSTEJN; ESTEVES, 2013; TSOUTSOUKI *et al.*, 2022)

1.4.2 Impacto De Fatores Ambientais

Os mecanismos epigenéticos regulam a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento sexual (JONES; BAYLIN, 2002). Em resposta ao estresse ambiental, esses mecanismos – como a metilação do DNA e modificações nas histonas – ajustam a atividade de genes relacionados ao eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG), que controla a secreção dos hormônios reprodutivos (JONES; BAYLIN, 2002). O estresse crônico, por exemplo, induz a metilação de genes associados ao receptor de glicocorticoides (NR3C1), aumentando a sensibilidade ao cortisol e desregulando a produção de LH e FSH, essenciais para o desenvolvimento dos gametas e a maturação sexual (SAFTIĆ MARTINOVIĆ *et al.*, 2024).

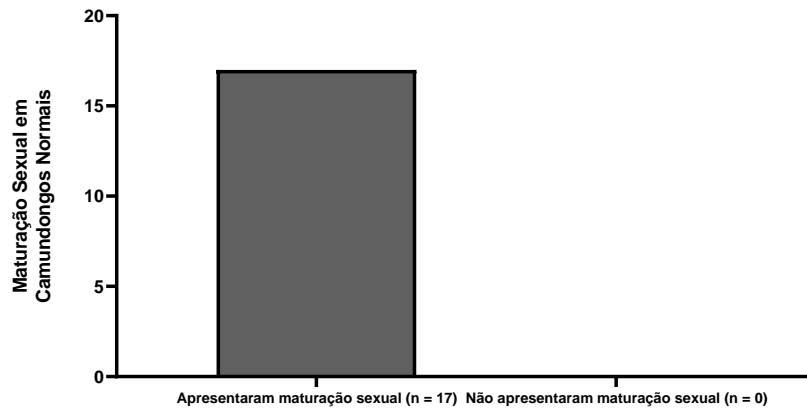
Além disso, o estresse ambiental contribui para o estresse oxidativo, que, por sua vez, promove alterações epigenéticas adicionais que prejudicam a saúde dos gametas e a função reprodutiva (SAFTIĆ MARTINOVIĆ *et al.*, 2024). Portanto, o estresse atua não só como um fator ambiental imediato, mas também como um modulador epigenético duradouro, influenciando a saúde reprodutiva a longo prazo.

1.5 JUSTIFICATIVA

Na literatura atual, a maioria dos estudos sobre essa linhagem não aborda a maturação sexual. Entre os que o fazem, não há consenso sobre a fertilidade desses animais. Alguns estudos, como (DOUGLAS; CAMPER, 2001), os classificam como totalmente inférteis, enquanto outros os consideram predominantemente inférteis ou com fertilidade reduzida (LIST *et al.*, 2021; TANG *et al.*, 1993). No entanto, não existem estudos que caracterizem os processos morfológicos e fisiológicos relacionados à maturação sexual nos machos da linhagem Ames com variantes patológicas dessa linhagem.

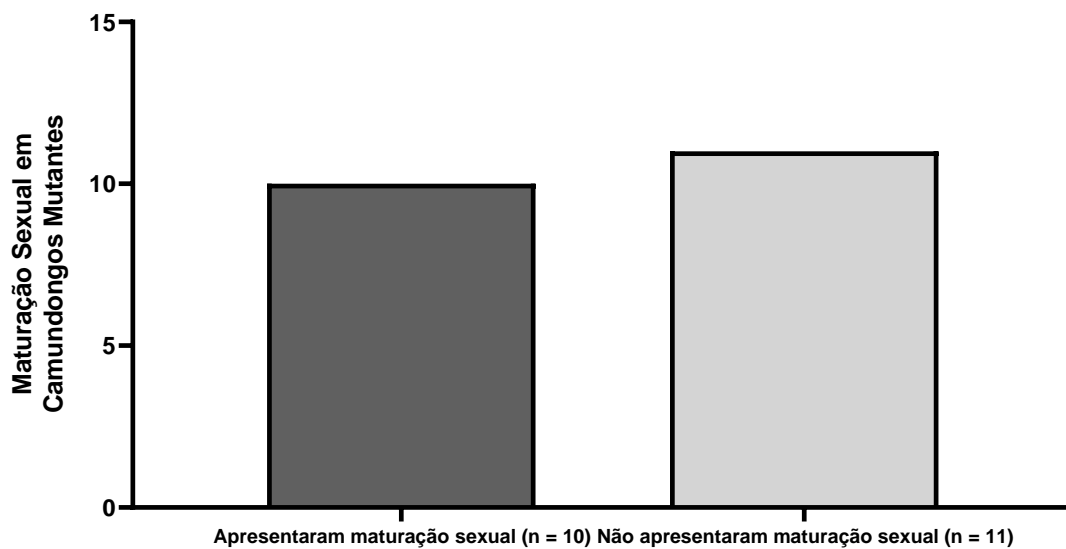
Foi realizado um estudo prévio, que buscou padronizar o evento de maturação sexual em camundongos machos da linhagem Ames, normais e mutantes, filhos de pais mutados submetidos a tratamento hormonal com restauo da fertilidade e mantidos no Biotério Central da FMUSP (AZEVEDO *et al.*, 2024). Os resultados revelaram que todos os animais normais (n = 17) atingiram a maturação sexual (Figura 1). Em contraste, 11 dos 21 animais mutantes não atingiram a maturação sexual completa (Figura 2). Esses dados revelam controvérsias relacionadas a maturação sexual dos camundongos machos da linhagem Ames mantidos no biotério central da FMUSP, uma vez que eles foram descritos inicialmente como inférteis.

Figura 1: Comparação entre a maturação sexual em camundongos machos da linhagem Ames normais, mantidos no Biotério Central da FMUSP (n = 17)



Fonte da imagem: Autoral

Figura 2: Comparação entre a maturação sexual em camundongos machos da linhagem Ames mutantes, mantidos no Biotério Central da FMUSP (n = 21).



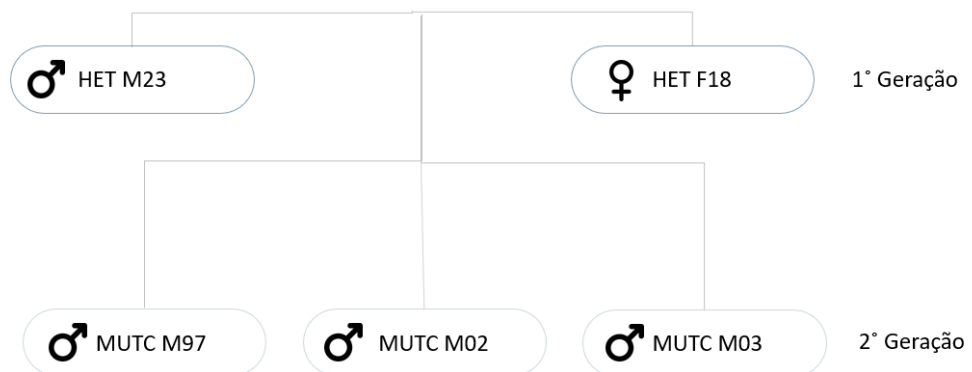
Fonte da Imagem: Autoral

Buscando compreender os casos de maturação sexual espontânea em camundongos machos da linhagem Ames ao longo de diferentes gerações, constatou-se, na análise inicial da primeira geração, que nenhum dos animais mutantes atingiu a maturação sexual de forma espontânea (Figura 3).

Vale ressaltar que o restauro de parâmetros reprodutivos por meio do tratamento hormonal com GH e levotiroxina já é amplamente descrito na literatura (BARTKE, 1965). Nas gerações subsequentes, foi realizado um cruzamento entre um macho mutante tratado hormonalmente e uma fêmea heterozigota normal. A prole resultante desse cruzamento foi novamente cruzada com um macho mutante submetido ao mesmo tratamento hormonal. Foi a partir dessa última geração que, pela primeira vez, observou-se maturação sexual espontânea em camundongos machos da linhagem Ames (Figura 4).

Figura 3: Heredograma referente as gerações 1 e 2 de camundongos Ames mantidos na FMUSP

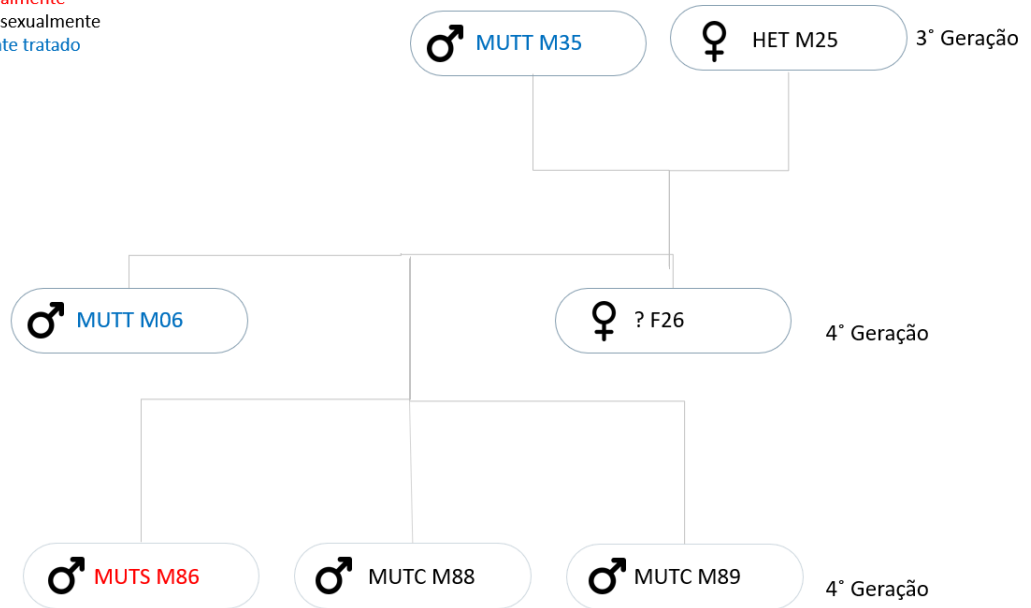
MUTS – maturou sexualmente
 MUTC – não maturou sexualmente
 MUTT – animal mutante tratado



Fonte da Imagem: (AZEVEDO *et al.*, 2024)

Figura 4: Heredograma referente as as gerações 3, 4 e 5 de camundongos Ames mantidos na FMUSP

MUTS – maturou sexualmente
 MUTC – não maturou sexualmente
 MUTT – animal mutante tratado



Fonte da Imagem: (AZEVEDO *et al.*, 2024)

Considerando a escassez de estudos sobre a maturação sexual espontânea em camundongos Ames machos não tratados e a falta de dados histológicos de animais que atingiram a maturidade sexual, além das contradições presentes na literatura, esse modelo animal apresenta um potencial significativo para estudos, uma vez que é possível expandir o conhecimento existente relacionado aos mecanismos reprodutivos em espécies portadoras de variações no gene *PROP1/Prop1*.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar a prevalência do fenômeno de maturação sexual espontânea em camundongos machos pertencentes a linhagem Ames mantidos na FMUSP

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e está registrado sob o número do protocolo: 2160/2024.

3.2 DESCRIÇÃO DA LINHAGEM

Os animais utilizados foram camundongos da linhagem *Prop1* *df/df* Ames (Figura 1), doados pela Professora Sally Camper da Universidade de Michigan, MI, EUA, e fazem parte do acervo da Faculdade de Medicina da USP. Essa linhagem carrega uma variante espontânea no gene *Prop1*, resultando na substituição do aminoácido serina pelo aminoácido prolina no códon 83 (p.Ser83Pro). Essa alteração é decorrente de uma alteração genética espontânea na qual uma timina (T) na posição 475 do cDNA (ENSMUST00000051159) será substituída por uma citosina (C).

Figura 5: Camundongos da linhagem *Prop1* *df/df* Ames. Na esquerda: Camundongo mutante, na direita: Camundongo normal.

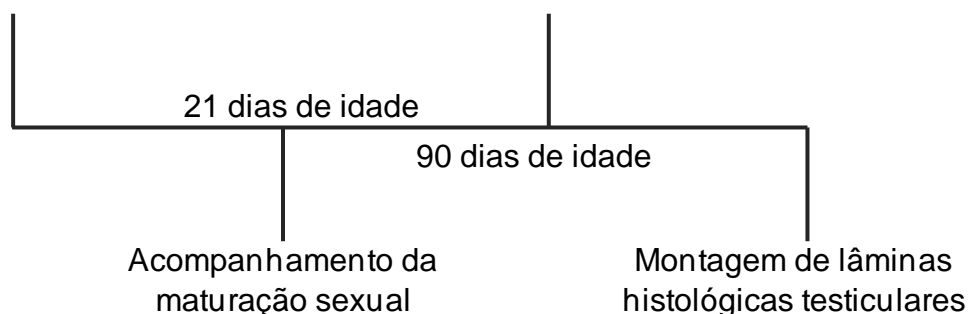


Fonte: Dra. Sally Camper, Universidade de Michigan, MI, EUA

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Formação de proles para a obtenção de machos para a avaliação

Eutanásia e coleta de tecidos



3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos dois grupos experimentais:

- **Grupo Controle:** Camundongos machos Ames homocigotos dominantes (Selvagens/WT), e camundongos machos Ames Heterocigotos
- **Grupo Mutante:** Camundongos machos Ames homocigotos recessivos (Mutantes)

Foi estabelecido um número amostral de 5 animais por grupo para as análises pré eutanásia; e um grupo amostral de 3 animais por grupo para análises pós eutanásia, incluindo as análises histológicas.

3.5 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram mantidos em um ambiente controlado, com temperatura mantida entre 20°C e 23°C, e um ciclo de iluminação claro/escuro de 12 h. Eles tiveram acesso à ração padrão de Purina e água ad libitum, seguindo os procedimentos específicos para a manutenção de animais experimentais no Biotério da Faculdade de Medicina da USP

Os acasalamentos ocorreram no biotério central da FMUSP, onde mutantes foram gerados através do cruzamento entre machos e fêmeas portadores da variante, que se encontram no estado de heterocigose.

3.56 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO PELO MÉTODO DE SANGER

Machos e fêmeas de genótipo normal foram submetidos ao sequenciamento genético pelo método de Sanger, com o objetivo de selecionar casais heterocigotos para a variante, possibilitando a obtenção de proles normais e mutantes.

3.6.1 *Extração de DNA*

O DNA foi extraído seguindo um protocolo adaptado do procedimento de isolamento de DNA genômico a partir de amostras de cauda de camundongos, conforme descrito por Tony Zangala (ZANGALA, 2007)

Inicialmente, fragmentos de 3 mm das extremidades das caudas dos camundongos foram coletados. A essas amostras, foram adicionados 500 µL de uma solução de lise composta por 50 µL de Tris-HCl 1 M, 20 µL de NaCl 5 M, 10 µL de SDS 10%, 5 µL de EDTA 0,5 M e 410 µL de água Milli-Q, seguidos pela adição de 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL). A mistura foi incubada em um shaker (TS1000

Termoshaker Biosan) a 60°C, com agitação a 1050 rpm, por uma hora.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.200 rpm. Em seguida, foram transferidos 500 µL de isopropanol gelado para um novo tubo eppendorf. O sobrenadante resultante da centrifugação inicial foi cuidadosamente transferido para o tubo contendo o isopropanol, sendo misturado por inversão até que o DNA se tornasse visível. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por mais 15 minutos.

Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e cada amostra recebeu 500 µL de etanol 70%. O etanol foi então removido, com o excesso sendo eliminado utilizando-se uma folha de papel toalha.

Por fim, 50 µL de tampão TE foram adicionados a cada amostra, e a solução foi homogeneizada em um shaker até que o pellet de DNA estivesse completamente dissolvido.

3.6.2 Amplificação do DNA por PCR

A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi realizada para amplificar exponencialmente um fragmento do gene *PROP1*, presente no DNA genômico previamente extraído, visando sua identificação por meio de eletroforese em gel e posterior reação de sequenciamento.

Após a extração, o fragmento de 582 pb, que inclui a variante Ser83Pro no gene *Prop1* da linhagem Ames, foi amplificado de acordo com um protocolo de amplificação previamente estabelecido e adaptado (DOLLÉ; SNYDER; VIJG, 2001) utilizando os primers Forward (5' CGCAACAGTGATGTGAGGATGG 3') e Reverse (5' AAGGCTGGAGTGTCGGTCTTGA 3').

Um total de 25 µL de produto de PCR foi obtido, utilizando-se os seguintes reagentes para uma única reação: 0,5 µL de DNTP 25 mM, 5 µL de tampão (5X Green GoTaq® Reaction Buffer), 0,2 µL da enzima Taq Polimerase (Ludwig Biotec), 1 µL de primers forward e reverse, 13,2 µL de H₂O autoclavada e 3 µL de DNA genômico. Com exceção do DNA, essas quantidades foram multiplicadas pelo número de reações realizadas.

As condições de termociclagem utilizadas para todas as amostras incluíram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, segunda desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C por 10 minutos, e uma etapa final a 15°C por tempo indeterminado para preservação das amostras no termociclador.

O produto de PCR obtido foi quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL, EUA) a 1% em tampão TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0). Foi utilizado o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, EUA). O gel foi submetido a uma corrente elétrica constante de 100V por 30 minutos. Posteriormente, ele foi observado no transiluminador de luz UV (UVP UV/White Transilluminator, Analytik Jena, Alemanha) e registrado por uma câmera digital (Ultra Cam G6, Ultra-LUM, EUA) acoplada ao equipamento. Após a observação e o registro do gel, as amostras seguiram para o processo de sequenciamento.

3.6.3 Reação de sequenciamento

Após a quantificação, o produto de PCR foi submetido a uma reação enzimática de purificação, na qual 30 ng foram purificados a partir dos 25 µL de produto de PCR obtido.

A reação de sequenciamento foi realizada seguindo as instruções do kit “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1”.

Após a reação de sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do software “Sanger Sequence Analysis” para a avaliação do genótipo.

3.7 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO SEXUAL EM CAMUNDONGOS MACHOS

A avaliação da maturação sexual se iniciou a partir do 21º dia após o nascimento e estendeu-se até os 90 dias de idade. O período de observação incluiu tanto o grupo controle quanto a prole do mutado tratado. O critério utilizado para determinar a maturidade sexual em ambos os grupos foi baseado na observação da descida testicular e na separação balanoprepucial. Após a confirmação da maturação sexual, os animais foram pesados em uma balança digital graduada em gramas,

utilizando-se a balança analítica de bancada modelo 9094 Plus da Toledo.

3.8 EUTANÁSIA

Aos 90 dias de vida, os animais foram submetidos a uma exposição controlada à solução de isoflurano (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brasil) em uma câmara hermética. Essa exposição resultou na inalação de uma dose excessiva da substância, levando à cessação da atividade vital. O momento em que o animal foi considerado sem vida foi determinado pela ausência de sinais de respiração e batimentos cardíacos. Em seguida, os animais foram agrupados e as medidas antropométricas foram registradas.

Após a coleta das medidas antropométricas, os animais foram dissecados para a remoção das gônadas, visando uma avaliação histológica detalhada desses tecidos.

3.9 COLETA DE DADOS ANTROPOMÉTRICOS

3.9.1 Avaliação do peso corporal e testicular

Foi realizada a avaliação do peso corporal dos camundongos da linhagem Ames em três momentos distintos: no início dos experimentos, no momento da maturação sexual e durante a eutanásia. Cada animal foi posicionado sobre uma balança digital (balança analítica de bancada 9094 Plus – Toledo) para mensuração do peso em gramas. Em cada uma das três medições, foi calculada a média de peso para o grupo com o fenótipo da variante patológica e para o grupo controle.

Para a avaliação do peso testicular, os testículos foram removidos após a eutanásia dos animais, por meio de uma incisão na cavidade abdominal. Em seguida, os tecidos foram limpos e pesados em uma balança eletrônica graduada em miligramas. Da mesma forma que para o peso corporal, foi calculada a média do peso testicular para ambos os grupos.

3.9.2 Avaliação do comprimento naso-anal

Para a determinação do comprimento naso-anal dos camundongos, cada animal foi medido no momento da eutanásia utilizando uma régua convencional graduada em milímetros. A média do comprimento naso-anal foi calculada para o grupo controle e para o grupo homocigoto para a variante patogênica.

3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TECIDOS

Após o procedimento de eutanásia, foi realizada a abertura da cavidade abdominal dos animais, seguida pela remoção dos testículos e eliminação do excesso de gordura. Uma das gônadas foi fixada por imersão em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Posteriormente, realizou-se a desidratação gradual em concentrações crescentes de álcool etílico, e o tecido foi incluído em parafina.

A análise gonadal foi conduzida por meio de cortes seriados de 5 µm de espessura dos blocos de parafina, utilizando como referência o eixo horizontal de cada órgão (sentido transversal). Os cortes foram posicionados em lâminas de vidro e submetidos à coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE), conforme descrito na Tabela 1.

Os testículos foram categorizados de acordo com o escore de Johnsen (tabela 5). Cada animal foi classificado com base na média da análise de 10 túbulos seminíferos isolados, os quais receberam uma pontuação de 1 a 10, baseada na caracterização dos túbulos seminíferos. A média dos dois grupos foi determinada a partir das médias das pontuações individuais dos camundongos, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1: Protocolo de coloração método Hematoxilina-Eosina (HE)

Estágio	Reagente	Duração
Desparafinização	Estufa 45°C	40 minutos
Desparafinização	Xilol I	10 minutos
Desparafinização	Xilol II	10 minutos
Hidratação	Álcool 100%	5 minutos
Hidratação	Álcool 80%	5 minutos
Hidratação	Álcool 70%	5 minutos
Lavagem	Água Corrente	1 mergulho
Coloração	Hematoxilina	3 minutos
Lavagem	Água corrente	10 minutos
Coloração	Eosina	3 minutos
Desidratação	Álcool 70%	3 mergulhos

Desidratação	Álcool 80%	3 mergulhos
Desidratação	Álcool 100%	3 mergulhos
Fixação do corante	Xilol I	2 minutos
Fixação do corante	Xilol II	2 minutos

* Montar lâminas com Meio de montagem (Entellan™ Novo) e lamínulas

Tabela 2: Descrição do escore de Johnsen

Pontuação	Descrição
10	Espermatogênese completa com muitos espermatozoides. Epitélio germinativo organizado, com espessura regular e luz aberta.
9	Muitos espermatozoides. Epitélio germinativo desorganizado, com evidente descolamento ou obliteração do lúmen.
8	Poucos espermatozoides (<5-10 por túbulo seminífero).
7	Ausência de espermatozoides e presença de muitas espermátides.
6	Ausência de espermatozoides e presença de poucas espermátides (<5-10 por túbulo seminífero).
5	Ausência de espermatozoides e espermátides. Presença de muitos espermatócitos.
4	Ausência de espermatozoides e espermátides. Presença de alguns espermatócitos (<5 por túbulo seminífero).
3	Presença de espermatogônias.
2	Ausência de células germinativas e presença de células Sertoli.
1	Ausência de células.

3.11 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A avaliação dos resultados foi realizada por meio de análises estatísticas, utilizando os testes t de Student e Kruskal-Wallis, por meio do software "R Studio", versão 10. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão para cada grupo, e valores de p menores ou iguais a 5% ($p \leq 0,005$) foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

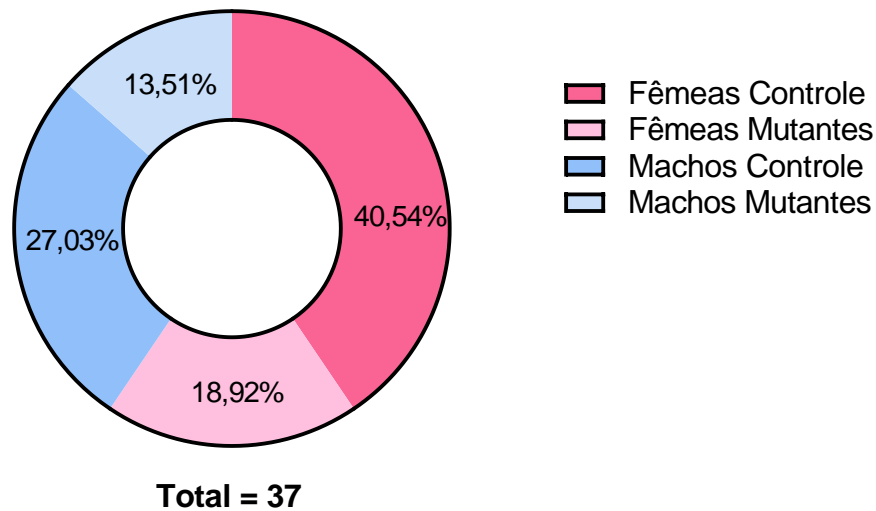
4.1 FORMAÇÃO DE CASAIS E DADOS DE PROLE

Ao final dos experimentos, foram obtidas 6 proles provenientes de casais heterozigotos, totalizando 37 filhotes, dos quais 15 eram machos. A proporção de

fêmeas foi maior, resultando em um número superior de animais fêmeas em comparação aos machos de ambos os genótipos. Entre as fêmeas, 40,54% eram normais e 18,98% mutantes. No caso dos machos, 27,03% eram normais e 13,51% mutantes, constituindo o grupo principal de interesse analisado neste estudo.

A Figura 2 apresenta as quantidades individuais de machos e fêmeas presentes nas proles obtidas, tanto no grupo controle quanto no grupo mutante.

Figura 6: Porcentagem de machos e fêmeas dos grupos Controle e Mutante provenientes das 6 proles geradas.



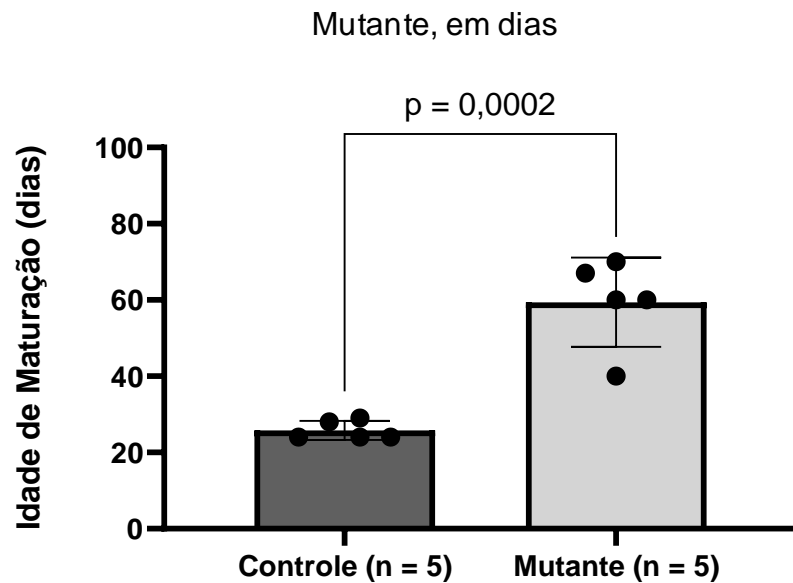
Fonte da imagem: Autoral

4.2 ACOMPANHAMENTO DA MATUREZA SEXUAL

Um total de 5 animais machos foi avaliado em cada grupo (Controle e Mutante). Todos os animais alcançaram a maturação sexual completa, tanto no grupo Controle quanto no grupo Mutante.

Entre os animais que atingiram a maturação sexual completa, foi observada uma diferença significativa nas idades de maturação sexual entre os dois grupos ($p = 0,0002$). Os camundongos do grupo Controle atingiram a maturação sexual, em média, aos 25 ($\pm 2,49$) dias de idade, enquanto os camundongos do grupo Mutante alcançaram a maturação por volta dos 60 ($\pm 11,70$) dias (Figura 7).

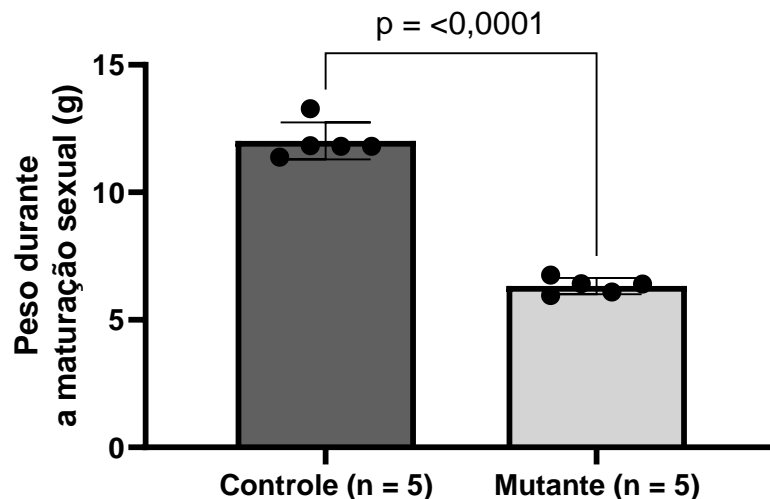
Figura 7: Comparação entre a idade de maturação sexual dos grupos Controle e



Fonte da imagem: Autoral

Também foi identificada uma diferença significativa no peso durante a maturação sexual nos dois grupos ($p = <0,0001$). Os animais do grupo controle apresentaram um peso médio de 12,02g ($\pm 0,73$ g) no momento da maturação sexual, enquanto os animais mutantes registraram um peso médio de 6,33g ($\pm 0,31$ g) (Figura 8).

Figura 8: Comparação entre os pesos dos grupos Controle e mutantes durante a maturação sexual



Fonte da imagem: Autoral

4.3 DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Devido à baixa quantidade de animais mutantes machos obtidos durante o período de experimentação, e considerando que nem todos alcançaram os 90 dias de vida

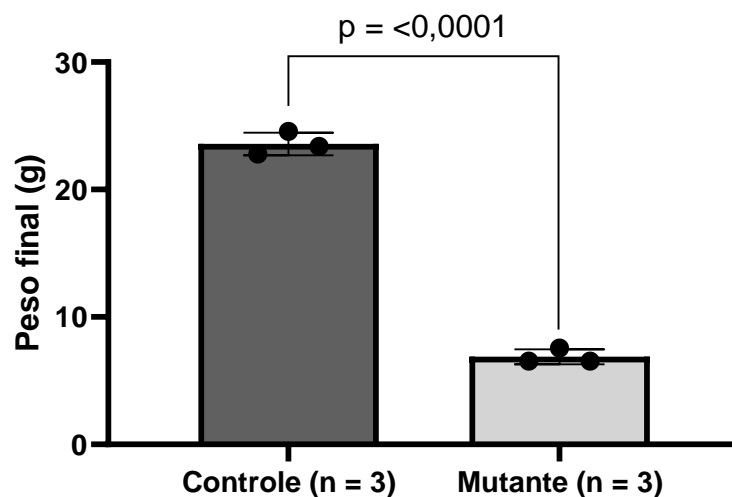
previstos para a realização dos procedimentos de eutanásia, foi definido um número experimental (n) de 3 animais machos maturados para cada grupo.

Aos 90 dias pós-natal, foram observadas diferenças significativas no peso final (Figura 9) e no comprimento naso-anal entre os grupos (Figura 10). ($p < 0,0001$ e $p = 0,0098$, respectivamente) O grupo controle apresentou um peso médio de 23,58g ($\pm 0,89$ g) e um comprimento de 7,7cm ($\pm 0,53$ cm), enquanto o grupo mutante exibiu um peso médio de 6,88g ($\pm 0,59$ g) e um comprimento de 5,7cm ($\pm 0,53$ cm) (Figura 9 e 10).

Vale ressaltar que houve diferença significativa ($p = <0,0001$) ao comparar os pesos iniciais e finais dos animais do grupo controle, enquanto não houve diferença significativa ao fazer essa mesma comparação em animais do grupo mutante ($p = 0,1184$) (Figura 11).

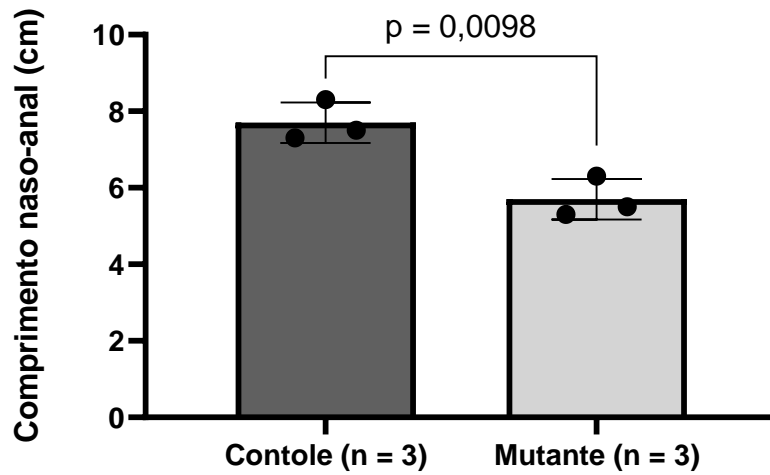
Não houve diferença significativa em relação ao peso testicular dos grupos Controle e Mutante ($p = 0,2071$). O grupo controle apresentou peso testicular médio de 0,136g ($\pm 0,082$ g), enquanto o grupo mutante apresentou peso testicular médio de 0,062g ($\pm 0,027$ g) (Figura 12).

Figura 9: Comparação entre os pesos dos grupos Controle e mutantes durante a eutanásia, aos 90 dias de vida



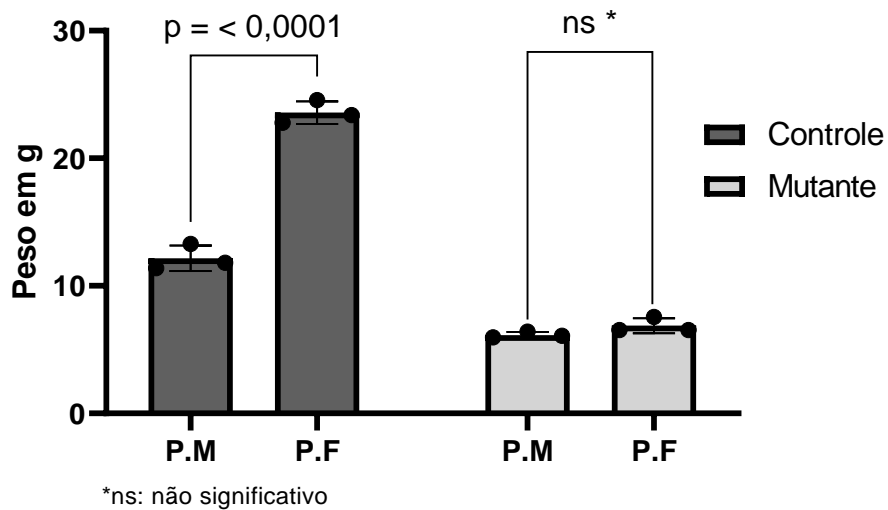
Fonte da imagem: Autoral

Figura 10: Comparação entre o comprimento naso-anal dos grupos Controle e mutantes durante a eutanásia, aos 90 dias de vida



Fonte da imagem: Autoral

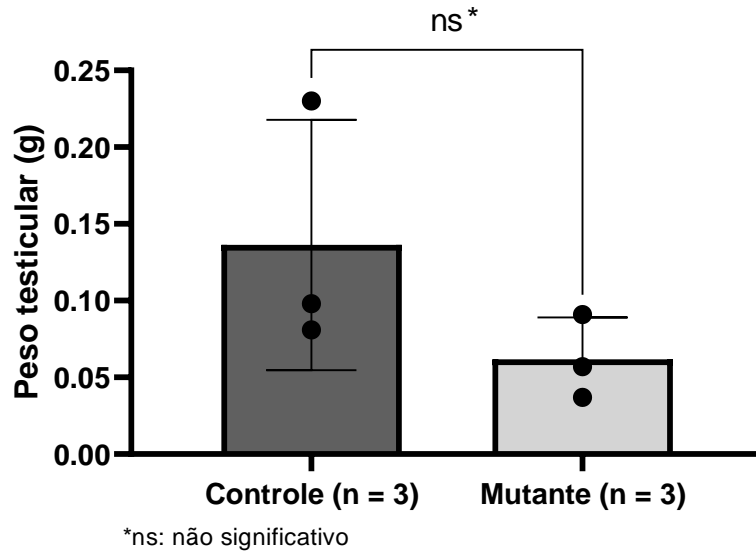
Figura 11: Comparação entre os Pesos de maturação (P.M) e Peso Final (P.F) dentro de cada grupo, Controle e Mutante.



*ns: não significativo

Fonte da imagem: Autoral

Figura 12: Comparação entre a diferença do peso testicular entre os grupos Controle e Mutante.

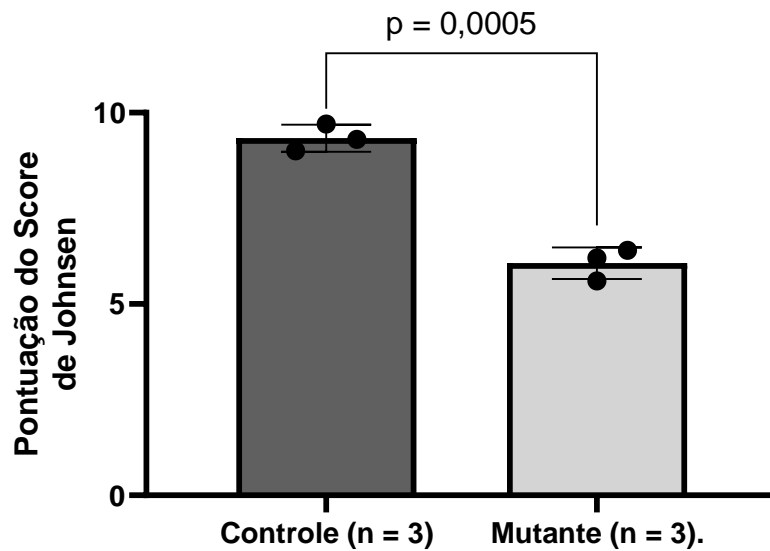


Fonte da imagem: Autoral

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise comparativa dos Escores de Johnsen revelou que houve diferença significativa ($p = 0,0009$) entre as pontuações médias do grupo Controle ($9,33 \pm 0,27$) e grupo Mutante ($6,07 \pm 0,42$) (Figura 13).

Figura 13: Comparação das pontuações obtidas pelo escore de Johnsen entre os grupos Controle e Mutante



Fonte da imagem: Autoral

As Tabelas 3 – 8 ilustram a pontuação do Escore de Johnsen de cada um dos 10 túbulos seminíferos analisados no grupo amostral de 3 animais Controle e 3 animais Mutantes. Essa análise revelou que os animais Controle apresentaram pontuações mais altas, variando de 8-10, porém com pontuações mais homogêneas. Já os animais Mutantes apresentaram pontuações mais baixas e variadas, variando de 5-8.

Tabela 3: Pontuações do escore de Johnsen individuais dos túbulos seminíferos individuais do Animal Controle 1 (C1)

Túbulo Seminífero	Escore de Johnsen
1	8
2	8
3	9
4	10
5	10
6	9
7	9
8	9
9	9
10	9
Média C1	9,0

Fonte da tabela: Autoral

Tabela 4: Pontuações do escore de Johnses individuais dos túbulos seminíferos individuais do Animal Controle 2 (C2)

Túbulo Seminífero	Escore de Johnsen
1	10
2	9
3	10
4	10
5	10
6	10
7	9
8	9
9	10
10	10
Média C2	9,7

Fonte da tabela: Autoral

Tabela 5: Pontuações do escore de Johnses individuais dos túbulos seminíferos individuais do Animal Controle 3 (C3)

Túbulo Seminífero	Escore de Johnsen
1	10
2	8
3	9
4	10
5	9
6	9
7	10
8	10
9	10
10	9
Média C3	9,3

Fonte da tabela: Autoral

Tabela 6: Pontuações do escore de Johnsen individuais dos túbulos seminíferos

individuais do Animal Mutante 1 (M1)

Túbulo Seminífero	Escore de Johnsen
1	6
2	5
3	6
4	7
5	6
6	7
7	7
8	6
9	7
10	7
Média M1	6,4

Fonte da tabela: Autoral

Tabela 7: Pontuações do escore de Johnsen individuais dos túbulos seminíferos individuais do Animal Mutante 2 (M2)

Túbulo Seminífero	Escore de Johnsen
1	6
2	5
3	5
4	8
5	5
6	6
7	6
8	5
9	5
10	5
Média M2	5,6

Fonte da tabela: Autoral

Tabela 8: Pontuações do escore de Johnses individuais dos túbulos seminíferos

individuais do Animal Mutante 3 (M3)

Túbulo Seminífero	Escore de Johnsen
1	6
2	6
3	7
4	5
5	8
6	5
7	6
8	7
9	7
10	7
Média M3	6,2

Fonte da tabela: Autoral

A análise histológica testicular do grupo Controle (Figura 14), apresentou espermatogênese completa e um epitélio germinativo espesso e organizado na maioria dos túbulos seminíferos analisados. Foi possível observar a presença de todas as células germinativas em todos os estágios: Espermatogônias; Espermatócitos primários e secundários; Espermátides alongadas e arredondadas e Espermatozoides em abundância.

No grupo Mutante (Figura 15), a análise histológica testicular revelou algumas semelhanças ao grupo Controle, como a presença da luz do túbulo e da maioria das células germinativas: Espermatogônias e Espermatócitos primários e secundários. Porém, em contraste com o que foi observado no grupo Controle, a maioria dos túbulos possuía uma quantidade reduzida de espermatozoides e espermátides. Em alguns dos túbulos analisados, não foi possível identificar ambas as estruturas.

Figura 14: Lâminas histológicas testiculares dos grupos Controle

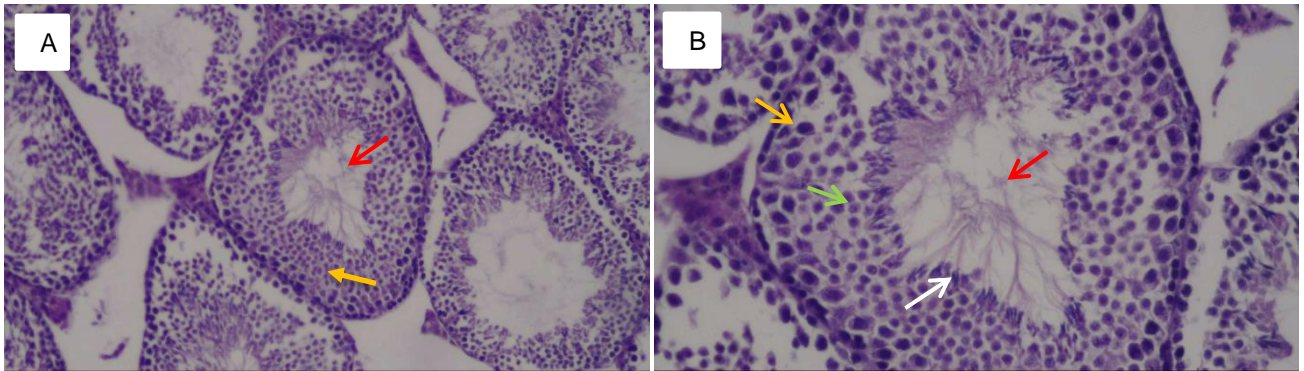


Figura 14: Padrão histológico testicular do grupo Controle. Em A (aumento de 100x), é possível observar a luz dos túbulos seminíferos (seta vermelha), e o epitélio (seta amarela) bem-organizados. Em B (aumento de 200x), é possível observar a distribuição das células germinativas em diferentes estágios: Espermatogônias (seta amarela); Espermatócitos (seta verde); Espermatídes alongadas (seta branca) e Espermatozoides (seta vermelha). Ambas as imagens coradas em HE (Hematoxilina-eosina). Fonte: Autoral.

Figura 15: Lâminas histológicas testiculares dos grupos Mutantes

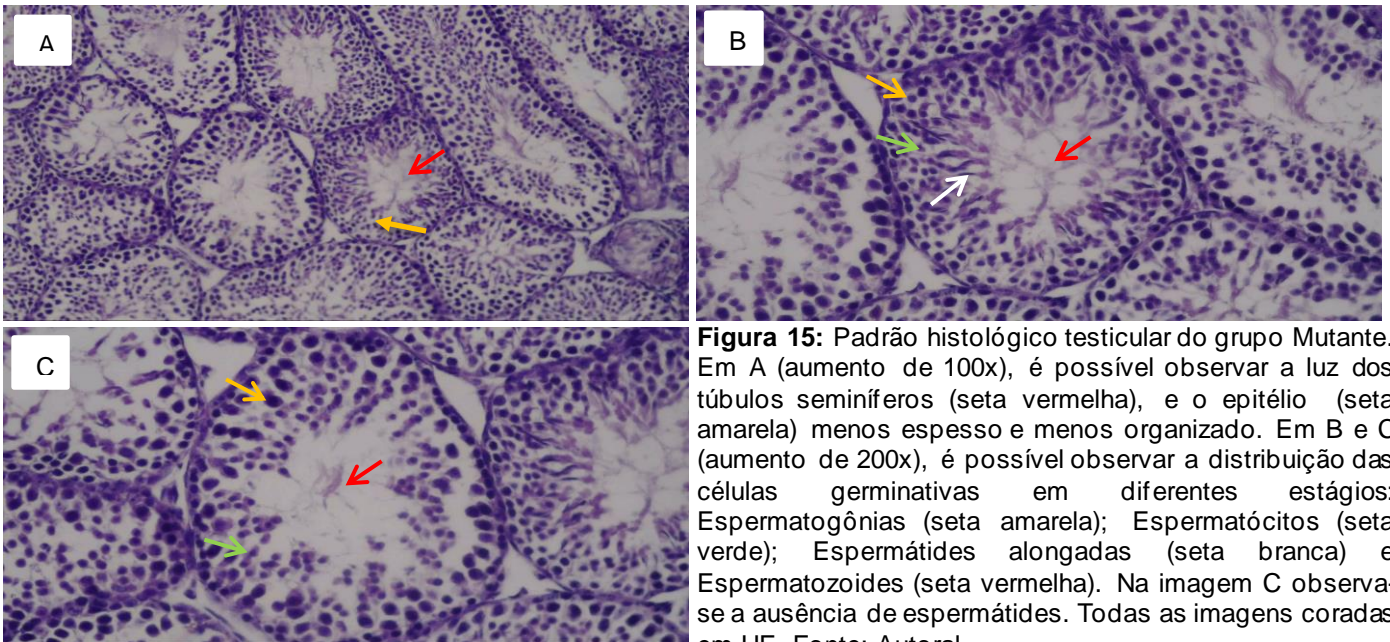


Figura 15: Padrão histológico testicular do grupo Mutante. Em A (aumento de 100x), é possível observar a luz dos túbulos seminíferos (seta vermelha), e o epitélio (seta amarela) menos espesso e menos organizado. Em B e C (aumento de 200x), é possível observar a distribuição das células germinativas em diferentes estágios: Espermatogônias (seta amarela); Espermatócitos (seta verde); Espermatídes alongadas (seta branca) e Espermatozoides (seta vermelha). Na imagem C observa-se a ausência de espermatídes. Todas as imagens coradas em HE. Fonte: Autoral

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a maturação sexual em camundongos machos da linhagem Ames, que apresentam deficiências hormonais significativas devido a uma mutação *missense* espontânea no gene *Prop1*. Essa mutação impacta a produção de diversos hormônios hipofisários, incluindo as gonadotrofinas, levando a consequências no desenvolvimento físico e reprodutivo. Com base no estudo preliminar, era esperado que dentro do grupo dos mutantes, existisse uma maioria de animais que atingiram a maturação sexual completa, e uma quantidade menor de

animais que não atingiram, porém, nossos resultados demonstraram que todos os camundongos pertencentes ao grupo Mutante atingiram a maturação sexual.

Camundongos da linhagem Ames foram descritos como um modelo de infertilidade, por Bartke, 1965. A infertilidade é atribuída ao atraso no desenvolvimento puberal e à interrupção da sinalização somatotrópica, que é fundamental para o crescimento e a função reprodutiva (BARTKE, 2005; VELDHUIS *et al.*, 2005). Estudos mais recentes, como o de Wang *et al.*, 2018, mostram que a falta de diversos hormônios (GH, PRL, TSH e gonadotrofinas) tem um impacto significativo na maturação sexual. No entanto, nossos resultados indicam que todos os camundongos mutantes conseguiram atingir a maturação sexual, o que sugere que pode haver mecanismos relacionados a maturidade sexual desses animais ainda não totalmente compreendidos.

Uma das possíveis explicações para esses achados envolve a epigenética transgeracional. A epigenética envolve mudanças na expressão gênica que ocorrem sem alterar a sequência de DNA. Isso inclui processos como a metilação do DNA e modificações na estrutura da cromatina, que podem regular se um gene é ativado ou silenciado (JONES; BAYLIN, 2002). Jablonka e Raz, 2009 argumentam que essas modificações podem ser transmitidas de geração em geração, afetando o fenótipo dos descendentes.

No contexto deste estudo, considerando que a indução da maturação sexual a partir do tratamento com GH e levitiroxina é bem descrita na literatura (BARTKE, 1965), é possível que os tratamentos hormonais recebidos por gerações anteriores de camundongos Ames mantidos na FMUSP tenham induzido alterações epigenéticas, que foram então herdadas e alteraram o desenvolvimento reprodutivo das gerações subsequentes, de forma que a os animais atuais atingissem a maturação sexual sem a necessidade do tratamento.

Essas modificações epigenéticas podem atuar como mecanismos adaptativos em resposta ao ambiente ou a intervenções hormonais, influenciando a expressão de genes críticos para a maturação sexual (JABLONKA; RAZ, 2009).

Os resultados antropométricos estão em concordância com os dados presentes na literatura. O grupo mutante apresentou peso de maturação, peso final e comprimento

naso-anal significativamente menores em comparação com o grupo controle, o que reforça o papel do hormônio do crescimento (GH). Veldhuis *et al.*, 2005 destacam que o eixo somatotrópico, envolvendo GH e IGF-I, é fundamental para o crescimento linear, desenvolvimento ósseo e maturação sexual, e sua ausência leva a atrasos significativos tanto no desenvolvimento físico quanto na puberdade.

Camundongos Ames sem tratamento hormonal apresentam peso corporal basal mais baixo e crescimento mínimo ao longo da vida (BARTKE, 1965). Esses achados são corroborados com os dados do presente trabalho.

A análise do peso testicular revelou uma diferença não significativa entre os grupos controle e mutante, principalmente devido ao tamanho amostral reduzido no grupo mutante. Essa limitação pode ter sido causada pela dificuldade em obter camundongos machos mutantes suficientes, um desafio relacionado a fatores genéticos que afetam a disponibilidade desses animais. Esse problema representa a principal limitação deste estudo.

Os Escores de Johnsen mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Mutante. O grupo Controle apresentou valores médios próximos ao máximo do escore ($9,37 \pm 0,49$), refletindo uma espermatogênese completa e túbulos seminíferos bem-organizados.

Na análise histológica do mutante, embora algumas características básicas tenham sido preservadas, os escores de Johnsen mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Além disso, a análise individual dos Escores de Johnsen em 10 túbulos seminíferos do grupo Mutante revelou escores em diferentes estágios, com uma média significativamente menor ($6,07 \pm 0,42$) quando comparado ao grupo Normal. Essa diferença pode estar associada ao tempo necessário para a maturação sexual, já que os animais normais atingem esse estágio aos 25 ($\pm 2,49$) dias, enquanto os mutantes apresentam um atraso significativo, maturando aos 60 ($\pm 11,70$ dias). Considerando essa disparidade, é possível que os testículos dos mutantes demandem um período mais longo para seu desenvolvimento. Estudos futuros devem explorar esse fenômeno com análises de espermogramas e estender o acompanhamento dos animais até os 120 dias, a fim de avaliar de forma mais precisa os impactos reprodutivos das alterações observadas.

Apesar das limitações, os resultados deste estudo abrem novas perspectivas sobre a fisiologia e adaptações fisiológicas dentro da linhagem Ames. A hipótese de que mecanismos epigenéticos transgeracionais podem estar modulando a maturação sexual e um possível restauro espontâneo da fertilidade, sugere que o ambiente e as intervenções hormonais podem ter um impacto duradouro nos mecanismos de maturação sexual desses animais. Pesquisas futuras devem focar em aumentar o n amostral das análises de maturação sexual, e na identificação e caracterização dessas alterações epigenéticas

Por fim, o reconhecimento da herança epigenética como um fator modulador do desenvolvimento abre discussões relevantes para a biologia evolutiva e médica. Se tais mecanismos forem comprovados, isso poderia ter implicações significativas, não apenas para modelos animais, mas também para compreender como condições endócrinas em humanos podem ser influenciadas por gerações anteriores, oferecendo novas abordagens para a intervenção terapêutica.

6. CONCLUSÃO

Na caracterização da prevalência do fenômeno da maturação espontânea em machos da linhagem Ames podemos concluir, que os mutantes apresentaram atraso significativo na maturação sexual, acompanhado por diferenças notáveis em parâmetros corporais e reprodutivos. As análises histológicas revelaram túbulos seminíferos desorganizados e em diferentes estágios do desenvolvimento, com escores de Johnsen significativamente inferiores aos do grupo controle, indicando espermatogênese incompleta.

Embora esses animais tenham alcançado a maturação sexual, este resultado pode estar relacionado ao tratamento hormonal aplicado aos pais, sugerindo a ocorrência de um efeito epigenético transgeracional. Essa hipótese reforça a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor os mecanismos epigenéticos envolvidos e seu impacto na maturação e funcionalidade reprodutiva.

6. REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, B. V. et al. Fertility induction associated with improved peripheral reproductive parameters in male Prop1^{df/df}mice subjected to GH and levothyroxine replacement. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 68, n. special issue, p. e240086, 18 nov. 2024.
- BARTKE, A. The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine. **General and Comparative Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 418–426, ago. 1965.
- BARTKE, A. Minireview: Role of the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor System in Mammalian Aging. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3718–3723, 1 set. 2005.
- CARVALHO, L. R. et al. PROP1-Related Combined Pituitary Hormone Deficiency. Em: ADAM, M. P. et al. (Eds.). **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.
- DASEN, J. S.; ROSENFELD, M. G. Signaling and Transcriptional Mechanisms in Pituitary Development. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 327–355, mar. 2001.
- DE PAULA, D. G. et al. Distinct effects of growth hormone deficiency and disruption of hypothalamic kisspeptin system on reproduction of male mice. **Life Sciences**, v. 285, p. 119970, nov. 2021.
- DE RIENZO, F. et al. Frequency of genetic defects in combined pituitary hormone deficiency: a systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort. **Clinical Endocrinology**, v. 83, n. 6, p. 849–860, dez. 2015.
- DI IORGI, N. et al. Developmental Abnormalities of the Posterior Pituitary Gland. Em: CAPPÀ, M. et al. (Eds.). **Endocrine Development**. Basel: KARGER, 2009. v. 14p. 83–94.
- DIVALL, S. A.; MERJANEH, L. Developmental Endocrinology. Em: **Avery's Diseases of the Newborn**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1324-1332.e1.
- DOLLÉ, M. E. T.; SNYDER, W. K.; VIJG, J. Genotyping the Prop-1 mutation in Ames dwarf mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, n. 15, p. 1915–1918, out. 2001.
- DOUGLAS, K.; CAMPER, S. A. Dwarfism, in Mice. Em: **Encyclopedia of Genetics**. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 591–593.
- FRAIETTA, R.; ZYLBERSTEJN, D. S.; ESTEVES, S. C. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 68 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 81–88, 2013.
- GAHETE, M. D.; LUQUE, R. M.; CASTAÑO, J. P. Models of GH deficiency in animal studies. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 6, p. 693–704, dez. 2016.
- JABLONKA, E.; RAZ, G. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. **The Quarterly Review of Biology**, v. 84, n. 2, p. 131–176, jun. 2009.

- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 6, p. 415–428, jun. 2002.
- KAPRARA, A.; HUHTANIEMI, I. T. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. **Metabolism**, v. 86, p. 3–17, set. 2018.
- LIST, E. O. et al. Mouse models of growth hormone deficiency. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 22, n. 1, p. 3–16, mar. 2021.
- MADEIRA, J. L. et al. Molecular analysis of brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different *PROP 1* alterations with three novel mutations. **Clinical Endocrinology**, v. 87, n. 6, p. 725–732, dez. 2017.
- MEHTA, A. et al. Congenital hypopituitarism: clinical, molecular and neuroradiological correlates. **Clinical Endocrinology**, v. 71, n. 3, p. 376–382, set. 2009.
- MELMED, S. et al. Pituitary Physiology and Diagnostic Evaluation. Em: **WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY**. 13. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. p. 175–228.
- NASONKIN, I. O. et al. Aged PROP1 Deficient Dwarf Mice Maintain ACTH Production. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28355, 1 dez. 2011.
- NAVARRO, V. M. Metabolic regulation of kisspeptin — the link between energy balance and reproduction. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 8, p. 407–420, ago. 2020.
- PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 4th edition ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2015.
- QIAN, Y. et al. Mice with gene alterations in the GH and IGF family. **Pituitary**, v. 25, n. 1, p. 1–51, fev. 2022.
- ROMERO, C. J.; NESI-FRANÇA, S.; RADOVICK, S. The molecular basis of hypopituitarism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 10, p. 506–516, dez. 2009.
- SAFTIĆ MARTINOVIĆ, L. et al. Decoding the Epigenetics of Infertility: Mechanisms, Environmental Influences, and Therapeutic Strategies. **Epigenomes**, v. 8, n. 3, p. 34, 5 set. 2024.
- SCHOENMAKERS, N. et al. Recent advances in central congenital hypothyroidism. **Journal of Endocrinology**, v. 227, n. 3, p. R51–R71, dez. 2015.
- SHENG, H. Z.; WESTPHAL, H. Early steps in pituitary organogenesis. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 6, p. 236–240, jun. 1999.
- SORNSEN, M. W. et al. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. **Nature**, v. 384, n. 6607, p. 327–333, nov. 1996.
- TANG, K. et al. Gonadotropin secretion, synthesis, and gene expression in human growth hormone transgenic mice and in Ames dwarf mice. **Endocrinology**, v. 132, n.

6, p. 2518–2524, jun. 1993.

TOOGOOD, A. A.; STEWART, P. M. Hypopituitarism: Clinical Features, Diagnosis, and Management. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 235–261, mar. 2008.

TSOUTSOUKI, J. et al. Kisspeptin in the Prediction of Pregnancy Complications. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 942664, 2022.

VELDHUIS, J. D. et al. Endocrine Control of Body Composition in Infancy, Childhood, and Puberty. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 1, p. 114–146, 1 fev. 2005.

VENKEN, K. et al. Impact of Androgens, Growth Hormone, and IGF-I on Bone and Muscle in Male Mice During Puberty. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 1, p. 72–82, 1 jan. 2007.

WANG, X. et al. Intestinal immunity in hypopituitary dwarf mice: effects of age. **Aging**, v. 10, n. 3, p. 358–370, 2 mar. 2018.

WATKINS-CHOW, D. E.; CAMPER, S. A. How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? **Trends in Genetics**, v. 14, n. 7, p. 284–290, jul. 1998.

ZANGALA, T. Isolation of Genomic DNA from Mouse Tails. **Journal of Visualized Experiments**, n. 6, p. 246, 29 jul. 2007.

ZHANG, S. et al. Single-cell transcriptomics identifies divergent developmental lineage trajectories during human pituitary development. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5275, 19 out. 2020.