

ANDRÉ LUCAS CALDEIRA BRANT DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS
ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO DO HOMEM**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte/MG
2021

ANDRÉ LUCAS CALDEIRA BRANT DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS
ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO DO HOMEM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia
Coorientadora: Dra. Fernanda R. C. L. Almeida

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte/MG
2021

043 Oliveira, André Lucas Caldeira Brant de.
Identificação e avaliação morfofuncional das espermatogônias-tronco do homem [manuscrito] / André Lucas Caldeira Brant de Oliveira. - 2021.
106 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia. Coorientadora: Dra. Fernanda R. C. L. Almeida.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Espermatogênese. 3. Espermatogônias. 4. Transplante Heterólogo. I. Chiarini-Garcia, Hélio. II. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
ANDRE LUCAS CALDEIRA BRANT DE OLIVEIRA

234/2021
entrada
1º/2016
2017755618

Às **quatorze horas** do dia **05 de abril de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO DO HOMEM**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Hélio Chiarini-Garcia**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Hélio Chiarini-Garcia	UFMG	Aprovado
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	Aprovado
Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta	UFV	Aprovado
Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes	UFTM	Aprovado
Dra. Elizete Rizzo Bazzoli	UFMG	Aprovado
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 05 de abril de 2021.**

Dr. Hélio Chiarini-Garcia (Orientador)

Dr^a. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida (Coo)

Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta

Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes

Dr^a. Elizete Rizzo Bazzoli

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a
pena acreditar nos sonhos que se tem”

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por me proporcionar a realização deste sonho de me tornar cientista. Você sempre esteve guiando meus passos e me iluminando durante todas as etapas desta minha caminhada. Em tempos de pandemia, não foi fácil suportar o medo, ansiedade e pressão, principalmente estando longe de casa. Foi na fé que encontrei o suporte necessário para seguir em frente. Muito obrigado!

Agradeço aos meus pais, Cléber e Fátima, por serem a base da minha vida. Sem o suporte de vocês, esta conquista não teria acontecido. Obrigado pelo amor, carinho, educação, compreensão e tudo que vocês me deram até hoje. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão. Este título de Doutor também é de vocês.

Ao professor Dr. Hélio Chiarini, que além de um exímio orientador, foi meu pai/amigo acadêmico durante todos esses anos. Sinceramente, não sei como lhe agradecer por tamanha dedicação para com a minha formação profissional e pessoal. Saiba que tudo que conquistei e irei conquistar daqui pra frente, tem/terá um dedo seu. Gratidão eterna!

À professora Dra. Fernanda Almeida, pela amizade e por todos os ensinamentos compartilhados durante o meu percurso na graduação e pós-graduação. Você é muito mais que uma coorientadora para mim, é um exemplo de ser humano e inspiração para toda vida. Obrigado!

I would like to express my gratitude to Professor Dr. Kyle Orwig for the tremendous support in the development of the second part of my PhD project at the MWRI (Pitt). His guidance helped me not only to develop my research but also to deal with the COVID-19 problems at the first months of the pandemic. We are just beginning our collaboration. Thanks a lot!

Aos meus avós: José (*in memoriam*), Brasília (*in memoriam*) e Maria do Carmo. Vocês, assim como meus pais, me proporcionaram tudo para que eu pudesse realizar este sonho. Hoje, sei que vocês estão pulando de alegria, aonde quer que estejam. Muito obrigado por tudo!

À minha irmã Gabriela, pelo carinho e companheirismo no dia-a-dia. Irmão bom é aquele que é sinônimo de amor e lealdade, e você é muito mais do que isso. Muito obrigado por sempre me apoiar em tudo.

À minha noiva, Fernanda Monteiro, que caminhou junto comigo desde o princípio desta trajetória acadêmica. Saiba que seu amor, carinho, compreensão e amizade tornam a minha vida mais leve e feliz. Apesar do percalços, você sempre apoia meus sonhos. Muito obrigado por tudo!

Aos médicos urologistas Dr. Augusto e Dr. Reginaldo por tornarem possível a realização deste trabalho. Não somente por me ajudarem na coleta dos materiais, mas pela parceria que desenvolvemos e pelos ensinamentos compartilhados durante estes anos.

Aos amigos e colegas do LABER. Durante os 10 anos que convivi no laboratório, me transformei completamente. Dos integrantes da pós-graduação aos alunos de iniciação científica, todos vocês foram extremamente importantes para minha formação. Além de tudo, formei amigos que levarei para a vida toda. Deixo aqui meu agradecimento especial para o Fernando, Thaís Mérici, Thaís Garcia, Lilian, Marina, Kennedy, Marcos, Lucas e Saffir.

I thank my fellow labmates from the Orwig Lab for the stimulating discussions that turned possible the development of my project. I also express my sincere thanks to Kien and Sarah for receiving me so well in Pittsburgh and for being such nice friends.

Aos professores do PPG Biocel por compartilharem um pouco de seus conhecimentos e ajudarem na minha formação pessoal e profissional. Serei sempre grato a cada um de vocês.

As agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiarem e tornarem possível o desenvolvimento deste trabalho.

A UFMG como um todo, por proporcionar um “universo” de conhecimento indescritível que transformou a minha vida. Gratidão eterna por tudo que vivenciei ali dentro. Sempre será a minha segunda casa!

Aos familiares por todo apoio que sempre recebi.

Aos amigos de infância do Galera Doida. A vida se torna uma jornada melhor quando temos amigos leais para celebrar os momentos de alegria e dar apoio nas situações difíceis.

Aos demais amigos que, de forma direta ou indireta, me ajudaram a chegar nesta conquista.

Enfim, OBRIGADO A TODOS VOCÊS!

RESUMO

A produção de espermatozoides no homem é dependente de uma população de células-tronco conhecida como espermatogônias-tronco (SSC) - células germinativas diploides que constituem a fonte da espermatogênese. Por consequência, o estudo da natureza das SSCs é de extrema relevância, pois qualquer alteração em seu comportamento pode provocar alterações em parâmetros da fertilidade masculina. Atualmente, as espermatogônias humanas são morfofuncionalmente divididas em: indiferenciadas do tipo A_{escura} (com a presença e ausência de vacúolo nuclear; A_{eVac} e A_{eNoVac} , respectivamente) e A_{clara} ; e diferenciada do tipo B. Apesar desta classificação, há escassas informações sobre a associação dos fenótipos espermatogoniais com expressão gênica, proliferação celular e dinâmica de desenvolvimento. Esta carência de dados não é somente devido à heterogeneidade biológica das espermatogônias, mas também devido à dificuldade de obtenção, processamento e análise de amostras testiculares, o que obstaculiza o desenvolvimento de estudos que possam reconhecer a morfologia e comportamento das espermatogônias, principalmente das SSCs. Obtendo testículos de sete pacientes férteis, o presente trabalho teve como objetivo investigar o comportamento das espermatogônias indiferenciadas do homem, *in vivo*, no que diz respeito à associação dos fenótipos com a dinâmica populacional, proliferação e morte celular, posicionamento em nicho, expressão de marcadores específicos bem como de sua capacidade de colonização. Para tal, inicialmente realizou-se análises histomorfométricas e de imunomarcagem para avaliação da expressão de marcadores espermatogoniais. Posteriormente, foram realizadas análises funcionais através de xenotransplante de *pools* selecionados de espermatogônias humanas, com potencial de células-tronco, para camundongos imunodeficientes inférteis. Demonstrou-se, de forma inédita em humanos, (a) que a variação morfológica da espermatogônia A_{escura} com vacúolo nuclear (A_{eVac}) corresponde a menor população espermatogonial (10%), (b) que são relativamente quiescentes, uma vez que apenas 10% delas estão em atividade mitótica, (c) além de estarem posicionadas mais próximas da vasculatura do que as demais espermatogônias, quando em estado G0. Além disso, (d) as A_{eVac} apresentam marcadores de espermatogônias que a caracterizam como indiferenciadas primitivas: 100% UTF1+, sendo que as quiescentes o expressam em alta intensidade, 95% são

TSPAN33+, 88% GFRA1+ e nenhuma expressa c-KIT. Em termos funcionais, mostrou-se que espermatogônias indiferenciadas com baixa atividade mitótica, como as TSPAN33+ (20% MCM7+; abrangendo 94% das A_{eVac}) possuem baixo potencial para colonizar e proliferar-se após xenotransplante para camundongos inférteis. Em conjunto, os achados aqui apresentados evidenciam a A_{eVac} como sendo a espermatogônia indiferenciada de reserva do testículo humano e que espermatogônias com estas características primitivas são ineficazes no que diz respeito à capacidade de colonizar um ambiente testicular permissivo, após xenotransplante para camundongos imunodeficientes inférteis. Dessa forma, clarificaram-se aspectos relacionados à biologia das espermatogônias indiferenciadas, o que será de extrema importância para estudos futuros, principalmente aqueles relacionados a investigações clínicas como terapias baseadas em espermatogônias-tronco.

Palavras-chave: espermatogênese humana, espermatogônia, espermatogônia-tronco, xenotransplante.

ABSTRACT

Sperm production in humans is dependent on a population of diploid spermatogonial stem cells (SSCs) that are the foundation of the spermatogenic process. Therefore, studying SSC behavior is extremely relevant, since any alteration in its biology may cause fertility impairments. Currently, human spermatogonia are morphofunctionally divided into: undifferentiated A_{dark} (with and without nuclear vacuole, A_{dVac} and A_{dNoVac} , respectively) and A_{pale} ; and differentiating type B spermatogonia. Despite that, there is a lack of information regarding the association of spermatogonial phenotype and gene expression, mitotic activity, and developmental dynamics. This issue is due to not only the biological heterogeneity of spermatogonia, but also the difficulty in obtaining, human testicular samples, which hinders the development of studies that could recognize their morphology and behavior, especially in terms of SSCs. By obtaining testis samples from seven fertile human donors, the present study aimed to investigate the undifferentiated spermatogonial behavior, *in vivo*, concerning the association of its phenotype with kinetic, cell proliferation and apoptosis, niche, expression of spermatogonial markers as well as colonizing activity. To this end, histomorphometric and immunostaining assays were initially performed to evaluate the expression of spermatogonial markers. Subsequently, functional analyses were carried out through xenotransplantation of sorted spermatogonial stem cell suspensions to infertile immunodeficient mice. Herein it was demonstrated for the first time in humans that (a) A_{dVac} spermatogonia corresponds to the smallest population (10%) of the testis, (b) which are relatively quiescent cells (10% in mitotic activity), (c) and being positioned nearby blood vessels while in G0 state. In addition, (d) A_{dVac} express spermatogonial markers in a primitive undifferentiated way: 100% UTF1+, with the quiescent ones expressing it in a high manner; 95% TSPAN33+; 88% GFRA1+; and without expressing c-KIT. Regarding SSC behavior, it was shown that undifferentiated spermatogonia with low mitotic activity, such as the TSPAN33+, (20% MCM7+, and covering 94% of A_{dVac}) have low potential to colonize and proliferating after xenotransplantation to infertile mice. Taken together, the present study presents A_{dVac} as the reserve undifferentiated spermatogonia of the human testis and that primitive undifferentiated spermatogonia are ineffective to colonize a permissive testicular environment after xenotransplantation. Thus, herein it was clarified aspects related to the human undifferentiated spermatogonial biology, which will be extremely important

for future studies, especially those related to clinical investigations such as spermatogonial stem cell-based therapies.

Key words: human spermatogenesis, spermatogonia, spermatogonial stem cell, xenotransplant.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Diferentes etapas da espermatogênese em mamíferos e as células que a compõe.....	24
FIGURA 2: Arranjo espacial dos estádios do ciclo do epitélio seminífero ao longo do túbulo seminífero de um roedor e primata.....	25
FIGURA 3: Características morfológicas dos diferentes fenótipos espermatogoniais do homem.....	26
FIGURA 4: Expressão gênica das espermatogônias de acordo com sua etapa de desenvolvimento dentro das fases indiferenciada e diferenciada.....	30
FIGURA 5: Nicho espermatogonial: posicionamento das espermatogônias indiferenciadas (SSC) e papel das células somáticas testiculares na regulação da autorenovação ou diferenciação espermatogonial.....	33
FIGURA 6: Descrição morfológica do núcleo e vacúolo nuclear da espermatogônia A_{eVac}	40
FIGURA 7: Metodologia aplicada para diferenciação morfológica entre as espermatogônias A_{eNoVac} e A_{clara} quando negativas ou positivas para o marcador de proliferação espermatogonial MCM7.....	44
FIGURA 8: Metodologia empregada para determinar a distância entre os diferentes fenótipos espermatogoniais e espermatócito em preleptóteno para o vaso sanguíneo mais próximo.....	46
FIGURA 9: Processamento das amostras testiculares referentes à realização da citometria de fluxo ativada por fluorescência e xenotransplante.....	49
FIGURA 10: Aspectos morfológicos dos diferentes fenótipos espermatogoniais do homem: A_{eVac} , A_{eNoVac} , A_{clara} e B, sob MLAR.....	56
FIGURA 11: População e cinética espermatogonial.....	58
FIGURA 12: Atividade mitótica espermatogonial.....	59
FIGURA 13: Posicionamento das espermatogônias (Spg) em relação ao vaso sanguíneo mais próximo.....	60

FIGURA 14: Caracterização da população de espermatogônias UTF1+.....	62
FIGURA 15: Caracterização da população de espermatogônias GFRA1+.....	63
FIGURA 16: Caracterização da população espermatogonial UTF1/GFRA1.....	64
FIGURA 17: Caracterização da expressão de c-KIT pela população das espermatogônias UTF1+ e GFRA1+.....	65
FIGURA 18: Identificação dos fenótipos espermatogoniais TSPAN33.....	67
FIGURA 19: Caracterização das espermatogônias TSPAN33+ em relação a atividade mitótica e expressão de marcadores espermatogoniais.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros hormonais dos doadores brasileiros.....	36
TABELA 2: Dados sobre os anticorpos primários utilizados nas análises histomorfométricas de imunohistoquímica.....	43
TABELA 3: Dados sobre os anticorpos secundários utilizados nas análises de imunofluorescência.....	44
TABELA 4: Dados referentes às amostras utilizadas no xenotransplante de espermatogônias humanas: células não-triadas, TSPAN33+/SSEA4- e TSPAN33+/SSEA4+ para os camundongos imunodeficientes.....	51
TABELA 5: Dados referentes às amostras utilizadas no xenotransplante de espermatogônias humanas TSPAN33-/SSEA4+ e TSPAN33-/SSEA4- para os camundongos imunodeficientes.....	52
TABELA 6: População da espermatogônia A_{evac} e das Outras Spg/PI (espermatogônia/preleptóteno), em relação à expressão, exclusiva ou em conjunto, de UTF1, GFRA1 e KIT, associado à proliferação celular (MCM7), por milímetro de membrana basal de túbulos seminíferos (n°/mm)	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
C	Graus Celsius
α MEM	Meio essencial mínimo alfa
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros
μ m	Micrômetros
A_{clara}	Espermatogônia A_{clara}
A_{escura}	Espermatogônia A_{escura}
A_{eNoVac}	Espermatogônia A_{escura} sem vacúolo nuclear
A_{eVac}	Espermatogônia A_{escura} com vacúolo nuclear
AR	Ácido retinóico
A_{und}	Espermatogônia indiferenciada
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	Albumina bovina sérica
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CD9	Gene de inibição de crescimento celular tipo 2
CES	Ciclo do epitélio seminífero
cm	Centímetros
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CORID	<i>Committee for Oversight of Research and Clinical Training</i>
CSF1	Fator estimulante de colônia 1
c-KIT	Receptor tirosina-quinase
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMRT1	Fator de transcrição 1 relacionado ao Doublesex e mab-3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPM	Desvio padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EpCAM	Molécula de adesão celular epitelial
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
EXOSC10	Componente do exossomo 10
FACS	Citometria de fluxo ativada por fluorescência
FBS	Soro fetal bovino
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR3	Receptor de FGF tipo 3
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFRA1	Receptor da família GDNF alfa-1
GPR125	Receptor 125 acoplado à proteína G
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da UFMG
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
hPA	Hectopascal – Pressão atmosférica
ICB-UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
ID4	Inibidor da proteína de ligação ao DNA 4
IF	Imunofluorescência
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IHC	Imunohistoquímica
ITGA6	Integrina alfa-6
kg	Quilogramas
KI67	Antígeno KI67
LH	Hormônio luteinizante
LPPR3	Proteína relacionada à fosfatase lipídica tipo 3
M	Molar
MeOH	Metanol
mg	Microgramas

mL	Microlitros
mm	Milímetros
MCM7	Fator de licenciamento de replicação de DNA 7
MLAR	Microscopia de luz de alta resolução
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
NCS	Nucléolo de célula de Sertoli
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCNA	Antígeno nuclear de célula proliferativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Espermatócito em preleptóteno
PIWIL4	Silenciador de genes mediado por RNA tipo Piwi4
RXR/RAR	Receptor de ácido retinóico
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SCF	Fator de célula-tronco
Spg	Espermatogônia
SSC	Espermatogônia-tronco
SSEA4	Antígeno embrionário estágio-específico 4
TSPAN33	Proteína da família tetraspanina 33
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTF1	Fator de transcrição de células indiferenciadas 1
VEGFA	Fator de crescimento endotelial A

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	ESPERMATOGÊNESE EM MAMÍFEROS.....	23
3.2	FASE ESPERMATOGONIAL E ESPERMATOGÔNIA-TRONCO.....	25
3.3	CINÉTICA E DINÂMICA ESPERMATOGONIAL (NÚMEROS, MITOSE E APOPTOSE).....	30
3.4	NICHO ESPERMATOGONIAL.....	31
3.5	IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E ATIVIDADE FUNCIONAL DAS ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO COMO PERSPECTIVA PARA TERAPIAS CELULARES.....	34
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	SELEÇÃO DE DOADORES.....	36
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DOS TESTÍCULOS.....	37
4.2.1	Processamento do material para análises morfofuncionais (histomorfometria e imunocoloração)	37
4.2.2	Processamento do material para citometria de fluxo e xenotransplante.....	38
4.3	OBTENÇÃO DOS CAMUNDONGOS.....	38
4.4	DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESPERMATOGÔNIAS SOB MICROSCOPIA DE LUZ DE ALTA RESOLUÇÃO.....	39
4.5	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOOLÓGICA DO NÚCLEO E SEU RESPECTIVO VACÚOLO, NA ESPERMATOGÔNIA <i>A_{EVAC}</i>	39
4.6	POPULAÇÃO ESPERMATOGONIAL, NÚMERO DE MITOSES E APOPTOSES (CINÉTICA ESPERMATOGONIAL), SOB MLAR.....	41
4.7	AVALIAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS POR IMUNOCOLORAÇÃO.....	42
4.7.1	Imunohistoquímica.....	42
4.8	PROLIFERAÇÃO ESPERMATOGONIAL POR IMUNOMARCAÇÃO DO ANTÍGENO MCM7.....	44
4.9	POSICIONAMENTO ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO AO VASO SANGUÍNEO MAIS PRÓXIMO (NICHO ESPERMATOGONIAL)	45

4.10	CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES ESPERMATOGONIAIS EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE MARCADORES ESPECÍFICOS, ATRAVÉS DE IMUNOFLORESCÊNCIA.....	46
4.10.1	Avaliação das populações de espermatogônias em relação à expressão de UTF1, GFRA1, c-KIT e TSPAN33.....	46
4.10.2	Quantificação da expressão de UTF1 através da intensidade de fluorescência.....	47
4.11	IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO ESPERMATOGONIAL TSPAN33 VIA IMUNOHISTOQUÍMICA.....	47
4.12	ISOLAMENTO DAS ESPERMATOGÔNIAS VIA CITOMETRIA DE FLUXO ATIVADA POR FLUORESCÊNCIA.....	48
4.13	PREPARO DOS ANIMAIS E XENOTRANSPLANTE.....	50
4.13.1	Preparação dos animais.....	50
4.13.2	Xenotransplante.....	50
4.14	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSPLANTE E COLONIZAÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS HUMANAS VIA IMUNOMARCAÇÃO POR <i>WHOLE-MOUNT</i>	53
4.14.1	Imunofluorescência por <i>whole-mount</i>	53
4.14.2	Quantificação das espermatogônias humanas no testículo dos roedores após xenotransplante.....	53
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	55
5.1	IDENTIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DOS DIFERENTES FENÓTIPOS ESPERMATOGONIAS.....	55
5.2	CINÉTICA ESPERMATOGONIAL.....	56
5.3	PROLIFERAÇÃO ESPERMATOGONIAL.....	58
5.4	NICHO ESPERMATOGONIAL.....	60
5.5	ATIVIDADE ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE UTF1.....	61
5.6	ATIVIDADE ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE GFRA1.....	61
5.7	ATIVIDADE ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO À COEXPRESSÃO DE UTF1 E GFRA1.....	63
5.8	ATIVIDADE DAS ESPERMATOGÔNIAS UTF1 E GFRA1 EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE C-KIT.....	65

5.9	IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO ESPERMATOGONIAL TSPAN33.....	67
5.10	CARACTERIZAÇÃO DAS ESPERMATOGONIAS TSPAN33 EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE MCM7, UTF1, GFRA1 E KIT.....	68
5.11	CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS TSPAN33.....	70
6	DISCUSSÃO	72
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
8	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO I	91

1. INTRODUÇÃO

As espermatogônias-tronco, ou células-tronco espermatogoniais (SSCs), são as células-tronco germinativas presentes no testículo pós-natal, sendo consideradas como a base e fonte de toda espermatogênese. A identificação e estudo do comportamento das SSCs se tornou uma das áreas mais instigantes da biologia da reprodução devido ao seu papel diretamente relacionado com à manutenção da espermatogênese e produção de espermatozoides, conseqüentemente, tornando-as de grande importância clínica. Qualquer modificação ou defeito funcional nestas células pode acarretar em alterações da fertilidade. Dessa forma, terapias baseadas em SSCs começaram a ser desenvolvidas visando não somente a preservação da fertilidade, mas também o tratamento de pacientes inférteis.

A exata natureza das espermatogônias-tronco humanas permanece obscura desde a primeira metade do século passado. Desde então, a maioria dos pesquisadores identificam as espermatogônias principalmente baseando-se em suas características morfológicas nucleares, segregando-as em: A_{escura} , A_{clara} e B (revisão em Ehmcke e Schlatt, 2006). Funcionalmente, estudos prévios as separaram em espermatogônias indiferenciadas do tipo A e diferenciadas do tipo B. Descreveu-se a indiferenciada A_{escura} como sendo a eventual SSC de reserva, pois permanece, na maioria do tempo, em estado de quiescência ao longo de todo o ciclo do epitélio seminífero (CES). Em contrapartida, a espermatogônia indiferenciada A_{clara} divide-se com elevada frequência, sendo considerada como a SSC progenitora. Ademais, a espermatogônia diferenciada do tipo B prolifera com elevada periodicidade, devido ao fato de ser a responsável por adentrar na fase meiótica da espermatogênese (Ehmcke e Schlatt, 2006). No entanto, até o presente momento, não foi possível descrever com exatidão a dinâmica populacional entre estes fenótipos espermatogoniais ao longo do CES.

Durante as últimas décadas, descobriu-se que uma única espermatogônia indiferenciada (A_{escura} e/ou A_{clara}) possui fisiologia extremamente complexa, não sendo possível atribuir qualquer marcador específico para estes subtipos. É sabido que as SSCs expressam marcadores tais como: UTF1, FGFR3, GFRA1,

entre outros, enquanto as espermatogônias do tipo B expressam c-KIT e DMTR1 (revisão em Fayomi e Orwig, 2018). Entretanto, pequenas frações das subpopulações de SSCs que expressam os marcadores indiferenciados supracitados também apresentam o receptor de membrana c-KIT. Interessantemente, estudos em primatas (humanos e não-humanos) identificaram que uma variante morfológica da espermatogônia A_{escura} que apresenta zona de rarefação na cromatina, denominada A_{eVac} , apresenta-se como uma célula relativamente quiescente, com pouca variação numérica ao longo dos estádios do CES, expressando vários marcadores de SSC e ausência de c-KIT (von Kopylow et al., 2012a; Caldeira-Brant et al., 2018; Pohl et al., 2019). Dessa forma, sugeriu-se que ela poderia ser uma espermatogônia-tronco em estado mais indiferenciado (primitivo) que as demais.

Recentemente, através de abordagens moleculares, demonstrou-se que existem, no mínimo, três estados funcionais diferentes dentre as espermatogônias indiferenciadas, onde genes distintos são regulados na medida em que elas se diferenciam (revisão em Sharma et al., 2019). Baseando-se nestes achados, aplicações funcionais para avaliação do potencial-tronco das SSCs vêm sendo utilizadas não somente para identificação das verdadeiras espermatogônias-tronco, mas também para validação de metodologias que possam ser clinicamente aplicadas. Dentre elas, o xenotransplante de espermatogônias humanas para camundongos imunodeficientes se destacou por evidenciar subpopulações primitivas de espermatogônias com atividade-tronco (revisão em Gul et al., 2020).

Apesar destes avanços, não há uma correlação entre os recentes marcadores identificados com os diferentes fenótipos espermatogoniais do homem. Somado a isto, até o presente estudo, existem escassas informações sobre o comportamento das espermatogônias humanas no que diz respeito a sua dinâmica populacional, tais como: proliferação e morte, posicionamento em nichos e expressão de marcadores indiferenciados ao longo do CES, *in vivo*. Tendo isto em mente, o objetivo do presente estudo foi de avaliar morfofuncionalmente os diferentes fenótipos espermatogoniais do homem, com

foco na A_{eVac} , visando identificar qual espermatogônia indiferenciada se comporta como a verdadeira célula-tronco espermatogonial.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e avaliar morfofuncionalmente quais fenótipos espermatogoniais se comportam como a espermatogônia-tronco do testículo humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram divididos em duas etapas: (1) avaliações morfométricas (A-E), com dados já publicados (Anexo I, Caldeira-Brant et al., 2020); e (2) avaliações funcionais (F-J), a serem publicadas. São eles:

- A. Reavaliar e descrever as características morfológicas dos fenótipos espermatogoniais sob microscopia de luz de alta resolução.
- B. Quantificar a população de cada um dos fenótipos espermatogoniais nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero e no testículo como um todo (cinética espermatogonial).
- C. Determinar a taxa de proliferação das espermatogônias através de imunomarcagem do antígeno MCM7.
- D. Investigar o posicionamento em nicho das espermatogônias em relação à proximidade com o vaso sanguíneo mais próximo.
- E. Descrever a expressão de marcadores espermatogoniais específicos para a fase indiferenciada: UTF1, GFRA1; e diferenciada: c-KIT, correlacionando-os com a atividade mitótica (expressão de MCM7).
- F. Identificar a expressão do marcador de espermatogônias-tronco primitivas TSPAN33 nos diferentes fenótipos espermatogoniais.
- G. Determinar a taxa de proliferação das espermatogônias TSPAN33+.
- H. Avaliar a coexpressão de TSPAN33 com os marcadores espermatogoniais UTF1, GFRA1 e c-KIT.

- I. Isolar as espermatogônias TSPAN33 via citometria de fluxo ativada por fluorescência.
- J. Determinar o potencial de espermatogônia-tronco das células TSPAN33 através de xenotransplante para camundongos imunodeficientes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ESPERMATOGÊNESE EM MAMÍFEROS

A espermatogênese é o processo de formação dos gametas nos indivíduos do sexo masculino, que ocorre de forma altamente organizada e cíclica nos testículos (Russell et al., 1990). O desenvolvimento dos gametas ocorre nos túbulos seminíferos, especificamente no epitélio seminífero que é composto por dois tipos celulares: as células somáticas, representadas pela célula de Sertoli, e as células germinativas (espermatogônias, espermátocitos e espermátides). Neste processo, durante sua progressão, a espermatogênese é dividida em três etapas (**Figura 1**): (a) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas divisões mitóticas; (b) fase meiótica ou espermatocitogênica, onde o material genético é reduzido à metade; (c) fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual as espermátides haploides diferenciam-se nos espermatozoides (Heller e Clermont, 1964). Todas as células germinativas presentes no epitélio seminífero constituem-se de gerações sucessivas de células conectadas através de pontes intracitoplasmáticas (citocinese incompleta após as divisões), dispostas em camadas concêntricas, bem definidas, onde sofrem processos mitóticos, meióticos, apoptóticos e de diferenciação celular. Estes processos constituem o evento biológico altamente eficiente denominado espermatogênese. A espermatogênese é um dos mais produtivos sistemas de autorenovação do corpo animal, variando de espécie para espécie nos mamíferos investigados (Heller e Clermont, 1964; Russell et al., 1990; revisão em Fayomi e Orwig 2018).

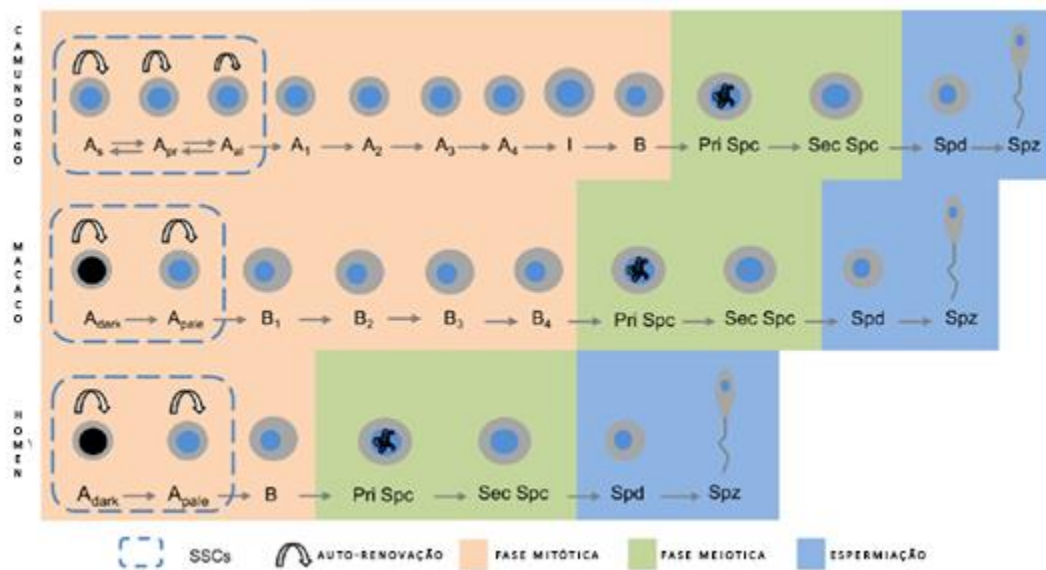


Figura 1. Diferentes etapas da espermatogênese em mamíferos e as células que a compõe (modificada de Bie et al., 2018). As, espermatogônia A isolada; Apr, espermatogônia A pareada; Aal, espermatogônia A alinhada; A1-A4, espermatogônias A1, A2, A3, e A4; B, espermatogônia B; Pri Spc, espermatócito primário; Sec Spc, espermatócito secundário; Spd, espermatíde; Spz, espermatozoide; Adark, espermatogônia A escura; Apale, espermatogônia A clara; B1-B4, espermatogônias do tipo B1, B2, B3 e B4; SSCs, espermatogônias tronco ou indiferenciadas.

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros (pós-púberes), as células germinativas não estão distribuídas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios, ordenados de modo espécie-específico (Heller e Clermont, 1964; Holt e Moore, 1984; Russell et al., 1990) e constituindo o ciclo do epitélio seminífero (CES) (**Figura 2**). Baseando-se no desenvolvimento do sistema acrossômico, o número de estádios que constituem o CES varia de espécie para espécie sendo que, por exemplo, para camundongos o ciclo do epitélio seminífero é dividido em XII estádios (Russell et al., 1990), para os primatas superiores como o *Rhesus* e saguis, XII e IX estádios, respectivamente (Clermont e Leblond, 1959; Holt e Moore, 1984) e para o homem VI estádios (Heller e Clermont, 1964; Nihi et al., 2017). O arranjo dos estádios do CES é, na maioria das espécies de mamíferos, segmentar (Leblond e Clermont, 1952; Russell, 1990; Chiarini-Garcia et al., 2009), isto é, apenas um estádio é observado em cada corte transversal de túbulo seminífero. No entanto, em algumas espécies de primatas como o homem, chimpanzé e sagui (Clermont, 1963; Haider et al., 1989; Sharpe, 1994), mais de um estádio pode ser observado por secção transversal de túbulo

seminífero, sugerindo que os estádios do ciclo estão distribuídos ao longo do comprimento do túbulo seminífero de uma forma não segmentar (**Fig. 2**).

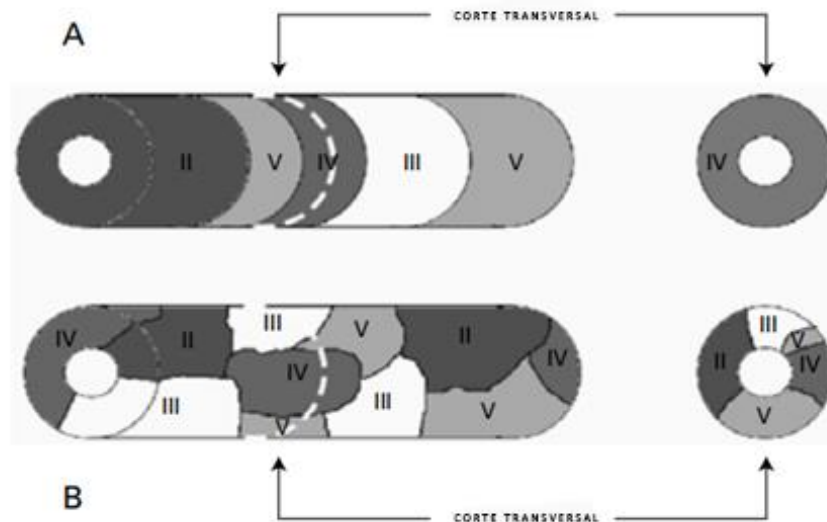


Figura 2. Arranjo espacial dos estádios do ciclo do epitélio seminífero ao longo do túbulo seminífero de um (A) roedor e (B) primata (adaptado de Luetjens et al., 2005). Legenda: I-V, estádios do CES.

3.2. FASE ESPERMATOGONIAL E ESPERMATOGÔNIA-TRONCO

Todo processo espermatogênico provém da divisão mitótica de uma única espermatogônia-tronco (SSC), que se encontra distribuída sobre a membrana basal do epitélio seminífero (Branca, 1924; Roosen-Runge e Barlow, 1953; Clermont, 1963). Esta espermatogônia tem a capacidade especial de gerar duas células idêntica a ela - processo conhecido como autorenovação, ou de originar duas espermatogônias diferenciadas em processo denominado de diferenciação (revisão em Fayomi e Orwig, 2018). Atualmente, as espermatogônias são divididas em dois tipos: indiferenciadas e diferenciadas (**Fig. 1**). Essa distinção pode ser feita pelas características morfológicas e/ou pela expressão/presença de diferentes marcadores moleculares específicos (von Kopylow et al., 2012; Nihi et al., 2017; Sohni et al., 2019). Nos roedores, foram identificadas três gerações de espermatogônias indiferenciadas ($A_{isolada}$, $A_{pareada}$ e $A_{alinhada}$) e seis gerações de espermatogônias diferenciadas (A1, A2, A3, A4, Intermediária e do tipo B) (de Rooij e Russell, 2000) (**Fig. 1**). Por outro lado, nos primatas, é descrita a

presença de duas gerações de espermatogônias indiferenciadas (A_{escura} e A_{clara}) e, dependendo da espécie, de uma a quatro gerações de espermatogônias diferenciadas do tipo B (Clermont e Leblond, 1959; Clermont, 1963; Caldeira-Brant et al., 2018) (**Fig. 1**).

Durante anos, as espermatogônias foram única e exclusivamente classificadas e diferenciadas pelas suas características morfológicas (revisão em Fayomi e Orwig, 2018). A espermatogônia indiferenciada A_{escura} é caracterizada pela presença de núcleo fortemente corado, com presença ou não de uma zona de rarefação na cromatina (vacúolo). A A_{clara} exibe morfologia nuclear fracamente corada, e as espermatogônias diferenciadas do tipo B são descritas como células redondas, de cromatina moderadamente corada, mas com presença de flocos de heterocromatina (**Fig. 3**; Heller e Clermont, 1964).

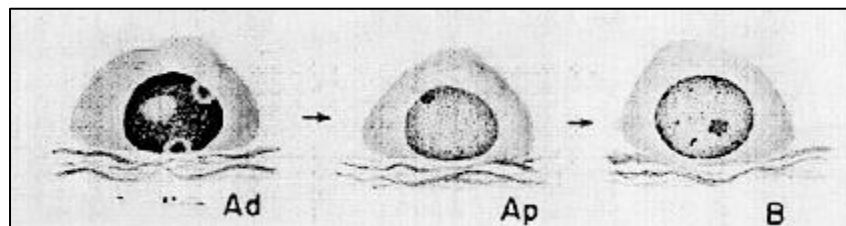


Figura 3. Características morfológicas dos diferentes fenótipos espermatogoniais do homem. Legenda: Ad, A escura; Ap, A clara; B, tipo B (Adaptado de Heller e Clermont, 1964).

Em termos funcionais, a investigação da atividade mitótica espermatogonial demonstrou que a A_{escura} se divide com pouca frequência durante o ciclo do epitélio seminífero de um indivíduo normal, mantendo-se como célula quiescente (Clermont e Leblond, 1959), o que a caracterizou como células-tronco de reserva. Mais adiante, ao investigar o comportamento dessas células após ações citotóxicas ou de irradiação, observou-se que ao reduzir a população de espermatogônias A_{clara} (devido ao seu alto potencial de proliferação), as A_{escuras} se dividiram ativamente até repor o estoque de A_{claras} , retornando ao seu estado de quiescência em seguida (Clermont, 1969; Oakberg, 1975). Desse modo, conclui-se que a espermatogônia A_{clara} seria a SSC ativa devido a sua capacidade mitótica de originar as espermatogônias diferenciadas

do tipo B, de se autorenovar e de renovar o estoque das A_{escuras} quiescentes (Clermont, 1969; Oakberg, 1975; van Alphen et al., 1988).

No entanto, este modelo de expansão espermatogonial é controverso. Outros estudos vêm demonstrando e reforçando alternativas para este modelo. Utilizando-se de um marcador de proliferação celular (BrdU - 5-bromo-2-desoxiuridina), Ehmcke et al. (2005) mostraram que algumas (~18%) A_{escuras} são positivas para este marcador, evidenciando que uma pequena porção desta geração espermatogonial está em atividade mitótica mesmo sob condições normais/fisiológicas. Desse modo, vários autores propuseram uma geração espermatogonial intermediária entre a A_{escura} e a A_{clara} denominada de $A_{\text{transição}}$, com morfologia nuclear intermediária entre elas, fato que já havia sido levantado por Fouquet e Dadoune (1986).

Não obstante, alguns autores propuseram que a A_{escura} e uma pequena população de A_{clara} pertencem a uma mesma geração espermatogonial, mas que se encontram em diferentes fases do ciclo celular: A_{escura} no estado G0 e A_{clara} nas demais fases (G1/S/G2/M) (Fouquet e Dadoune, 1986; Hermann et al., 2009, 2010). O conceito de que as A_{escuras} estão em um estado de quiescência também foi suportado pelo trabalho de von Kopylow e colegas (2012a,b), que demonstraram a expressão do marcador de proliferação celular ki-67 somente pelas A_{claras} . Entretanto, este estudo considerou como sendo A_{escura} somente as espermatogônias que apresentavam, além das características morfológicas típicas, zonas de rarefação da cromatina (vacúolo nuclear).

Uma peculiaridade das A_{escuras} em primatas é que algumas destas células apresentam vacúolos nucleares, sendo consideradas por alguns (von Kopylow et al., 2012a, b; Pohl et al. 2019) como sendo as “verdadeiras” A_{escura} , enquanto por outros como sendo apenas uma variação morfológica desta geração espermatogonial (Di Persio et al., 2017; Nihi et al., 2017; Caldeira-Brant et al., 2018). Estudos de von Kopylow et al. (2012a,b) demonstraram que esta zona de rarefação da cromatina é rica em uma proteína denominada EXOSC-10, servindo como um marcador para identificação destas células. As espermatogônias A_{escuras} contendo este vacúolo nuclear expressam marcadores

de espermatogônias-tronco tais como: ID4, FGFR3, UTF1, entre outros (von Kopylow et al., 2012a,b). Sabe-se que o EXOSC10, além de ser encontrado nos vacúolos nucleares, está presente nos nucléolos e possui importante atividade no processamento de mRNAs e de miRNAs. O envolvimento do EXOSC10 na regulação de miRNAs pode estar envolvido com o processo de autorenovação das espermatogônias, já que vários miRNAs regulam este mecanismo (Bie et al., 2018). Além disso, este componente dos exossomos está envolvido no silenciamento epigenético de alguns cromossomos e é essencial para o desenvolvimento completo da espermatogênese, já que a ausência do EXOSC10 leva a infertilidade (Jamin et al., 2017; Zinder e Lima, 2017).

No que concerne as espermatogônias diferenciadas de primatas, existe um número menor de gerações espermatogoniais quando comparado aos roedores. Essa diferença no número de gerações de espermatogônias do tipo B também é observada quando comparamos diferentes primatas. Enquanto no macaco *Rhesus* são observadas quatro gerações de espermatogônias do tipo B (Clermont e Leblond, 1959), no homem (Clermont, 1963; Nihi et al., 2017) apenas uma geração é descrita (**Fig. 1**). Em termos moleculares, todas as gerações de espermatogônias diferenciadas, de roedores a humanos, expressam o receptor c-KIT (Hermann et al., 2009; von Kopylow et 2012; Di Persio et al., 2017).

Na tentativa de correlacionar os três clássicos estados/fenótipos espermatogoniais do homem (A_{escura} , A_{clara} e B) com marcadores moleculares específicos e, dessa forma, elucidar mecanismos relacionados à dinâmica espermatogonial, trabalhos recentes da literatura vêm demonstrando achados importantes (Jan et al., 2017; Guo et al., 2017, 2018; Hermann et al., 2018; Wang et al., 2018; Sohni et al., 2019; Shami et al., 2020). Baseando-se exclusivamente em achados moleculares de espermatogônias humanas, Guo e colaboradores (2017, 2018) demonstraram que elas podem ser divididas em cinco etapas de desenvolvimento: (1) estado mais primitivo e de reserva (baixa taxa de proliferação), com alta expressão de marcadores-tronco tais como UTF1, ID4, FGFR3, TSPAN33, entre outros; (2) baixa atividade mitótica, alta expressão de GFRA1, SSEA4, entre outros marcadores, além da diminuição da expressão dos

marcadores da fase 1; (3) atividade mitótica moderada, redução da expressão de marcadores indiferenciados; (4) transição entre o estado indiferenciado para o diferenciado devido principalmente a expressão de c-KIT e elevada atividade metabólica celular; (5) estado diferenciado com elevada proliferação celular, expressão de c-KIT e ausência da expressão de marcadores de SSC (**Fig. 4A**). Não obstante, trabalho de Hermann e colaboradores (2018) demonstrou quatro etapas de transição entre as espermatogônias humana baseando-se em transcriptoma de células isoladas. Entretanto, eles dividiram estas gerações em (1) duas gerações de espermatogônias indiferenciadas: SSC e espermatogônia progenitora; e (2) duas gerações de espermatogônias diferenciadas: pouco diferenciada e completamente diferenciada. Posteriormente, Sohni et al. (2019) caracterizaram essas quatro etapas de expressão gênica como sendo três referentes às espermatogônias indiferenciadas (SSC-1B, SSC1A/C e SSC2) e uma relacionada a espermatogônia diferenciada (**Fig. 4B**).

Adicionalmente, através destes achados moleculares, descobriu-se novos genes expressos exclusivamente durante a fase primitiva das SSC tais como TSPAN33, LPPR3 e PIWIL4, além de demonstrar que o UTF1 começa a ser expresso na fase neonatal pelas pré-espermatogônias (gonócitos), diminuindo progressivamente sua expressão até momentos antes da entrada na fase diferenciada, onde se inicia a expressão de c-KIT e DMRT1 (**Fig. 4B**; Sohni et al., 2019; Shami et al., 2020; Tan et al., 2020). Em contraposição, através de avaliações imunohistoquímicas, trabalho de Di Persio e colaboradores (2017) demonstrou que uma pequena porção de espermatogônias diferenciadas c-KIT+ também expressam o marcador indiferenciado UTF1, indicando uma transição mais gradativa entre ambas as fases.

Dessa forma, até o presente momento, conclui-se que as espermatogônias humanas são uma população transiente e heterogênea no que diz respeito a expressão gênica e dinâmica populacional, não sendo possível associar um marcador específico para cada fenótipo, o que impede a confirmação do número exato de gerações espermatogoniais.

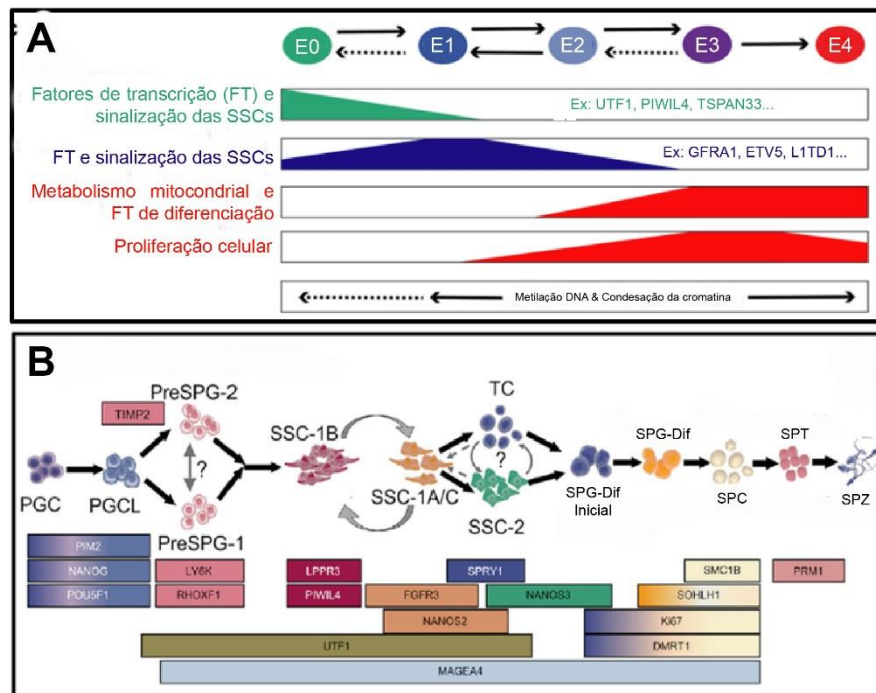


Figura 4. Expressão gênica das espermatogônias de acordo com sua etapa de desenvolvimento dentro das fases indiferenciada e diferenciada. (A) Representação da dinâmica espermatogonial humana baseada na expressão gênica e metabolismo celular, de acordo com os cinco estados funcionais observados (E0-E4) (adaptado de de Guo et al., 2018). (B) Modelo de progressão das células germinativas humanas baseado na expressão gênica de marcadores específicos (adaptado de Sohni et al., 2019). PGC, célula germinativa primordial; PGCL, células similares a germinativa primordial; PreSPG, pré-espermatogônia; SSC, espermatogônia-tronco; TC, espermatogônia de transição; SPG-Dif, espermatogônia diferenciada; SPC, espermatócito; SPT, espermatídes; e SPZ, espermatozoide.

3.3 CINÉTICA E DINÂMICA ESPERMATOGONIAL (NÚMEROS, MITOSE E APOPTOSE)

A utilização dos estádios do CES é de grande importância para o estudo da proliferação e morte (dinâmica populacional) das células germinativas, principalmente das espermatogônias, uma vez que permite investigar dentro de determinadas regiões sucessivas do epitélio seminífero a progressão e expansão destas células, em determinado espaço de tempo. Atualmente, utilizando-se da técnica de microscopia de luz de alta resolução (MLAR) é possível identificar morfologicamente, com bastante exatidão, os diferentes fenótipos espermatogoniais, independente de se fazer correlação com os estádios do CES (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Nihi et al., 2017; Caldeira-Brant et al., 2018). Dessa forma, as espermatogônias podem ser reconhecidas

em regiões onde não existem espermatogênese completa, como em casos de parada de maturação, animais pré-púberes (Drummond et al., 2011) ou em animais transgênicos (Rezende-Melo et al., 2020).

Estudos sobre a cinética espermatogonial permitiram identificar em roedores, por exemplo, que as divisões da espermatogônia $A_{isolada}$ para $A_{alinhada}$ ocorrem em todos os estádios do CES, enquanto a diferenciação de $A_{alinhada}$ para A_1 ocorre somente nos estádios VII e VIII do CES. Em se tratando de primatas, vários estudos descreveram a cinética espermatogonial e a duração do processo espermatogênico como um todo (Millar et al., 2000; Weinbauer, 2001; Leal e França, 2006). No entanto, em estudo específico sobre as células da linhagem espermatogonial do sagui *Callitrix penicillata*, Caldeira-Brant et al. (2018) demonstraram, pela primeira vez em primatas, que a espermatogônia A_{escura} com vacúolo (A_{eVac}) se comporta, em termos cinéticos, de forma diferente das demais espermatogônias ao longo do CES, sugerindo-as como as verdadeiras SSC de reserva. Além disso, atestou-se, também pela primeira vez, a existência de duas gerações de espermatogoniais do tipo B para esta espécie, correlacionando achados morfológicos com a dinâmica populacional. Em relação aos humanos, até o presente momento, ainda não foi feita uma análise estágio-específica da cinética espermatogonial. Dessa forma, este tipo de avaliação é premente no homem, visando conhecer de forma detalhada a proliferação das diferentes gerações espermatogoniais, bem como de suas mitoses e apoptoses, em cada um dos respectivos estádios do CES. Os resultados obtidos destas avaliações junto aos achados moleculares podem, em associação, fornecer informações morfofuncionais mais robustas da dinâmica da fase proliferativa do processo espermatogênico do homem.

3.4 NICO ESPERMATOGONIAL

Para que um tecido seja renovado, as células-tronco presentes neste ambiente devem ter a capacidade de autorenovação, mantendo, desta forma, um estoque de células indiferenciadas. Além disso, as células-tronco são capazes de produzir células filhas comprometidas em se diferenciar, mantendo a funcionalidade do tecido a qual fazem parte (Watt e Hogan, 2000; Spradling

et al., 2001). O microambiente (nicho) que permite este funcionamento pode ser constituído de células somáticas e matriz extracelular que produzem e secretam substâncias que controlam o comportamento das células tronco, estimulando ou inibindo-as (Lin, 1997; Spradling et al., 2001; Zao e Garbers, 2002; Tsai et al., 2002).

O epitélio seminífero é um dos tecidos do organismo com um dos mais bem conhecidos sistema de autorenovação, sendo capaz de manter uma espermatogênese adequada devido à presença das células-tronco espermatogoniais. Considerada como “célula-mãe” ou “célula-enfermeira” da espermatogênese, a célula de Sertoli é extremamente importante dentro do nicho espermatogonial (revisão em França et al., 2016). Além das inúmeras funções que ela exerce para manter a produção espermática adequada, ela produz e secreta fatores que são responsáveis tanto por induzir a autorenovação espermatogonial, principalmente através do GDNF, e quanto à diferenciação, através do SCF e o ácido retinóico (AR) (**Figura 5**). Enquanto o GDNF regula a autorenovação espermatogonial através de sua interação com o receptor de membrana GFR α -1 (Meng et al., 2000), por outro lado, o SCF e o AR controlam a diferenciação das espermatogônias indiferenciadas através da interação com seus receptores c-KIT e RXR/RAR, respectivamente (Griswold et al., 1989; Griswold e Hogarth, 2018).

As células somáticas que estão presentes no interstício testicular também são de extrema importância na produção e liberação de fatores controladores do comportamento espermatogonial, seja de autorenovação ou diferenciação (**Fig. 5**; revisão em Potter e DeFalco, 2017). As células de Leydig produzem a testosterona, que coordena grande parte da atividade das células de Sertoli e de células intersticiais tais como: células peritubulares mióides, macrófagos e a própria célula de Leydig, controlando a expressão de fatores tais como: IGF1 (Moore e Morris, 1993) e CSF1 (Oatley et al. 2009). O sistema vascular também tem um papel central no comportamento e posicionamento das células tronco em diversos tecidos, inclusive no testículo. Além de disponibilizar para o parênquima testicular os hormônios gonadotróficos (LH e FSH), micronutrientes e oxigênio, as células endoteliais dos vasos sanguíneos secretam VEGFA. O

VEGFA além de ser importante para o desenvolvimento e remodelamento da vascularização testicular durante a fase fetal de mamíferos, possui um papel central na sobrevivência, autorenovação e diferenciação das células germinativas em roedores (**Fig. 5**) (Caires et al., 2012; Lu et al., 2013).

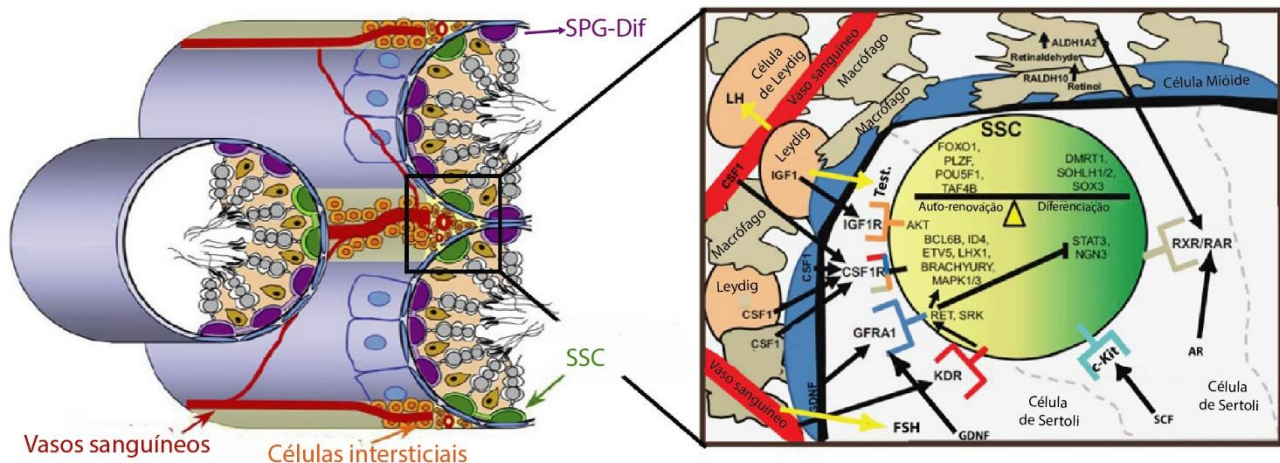


Figura 5. Nicho espermatogonial: posicionamento das espermatogônias indiferenciadas (SSC) e papel das células somáticas testiculares na regulação da autorenovação ou diferenciação espermatogonial (Adaptado de Shetty & Meistrich, 2007 e Potter e De Falco, 2017). SPG-Dif, espermatogônia diferenciada.

Neste contexto, trabalhos desenvolvidos por Chiarini-Garcia e colaboradores (Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003) foram os primeiros a demonstrar em mamíferos que as espermatogônias indiferenciadas se mantêm em regiões específicas do epitélio seminífero, próximas ao interstício testicular onde estão concentradas células de Leydig, macrófagos e vasos sanguíneos (**Fig. 5**). Posteriormente, este posicionamento preferencial foi confirmado em várias espécies de mamíferos (Chiarini-Garcia et al., 2009; do Nascimento et al., 2009; Costa et al., 2012). Recentemente, Caldeira-Brant e colaboradores (2018) demonstraram, pela primeira vez em primatas, que as espermatogônias A_{eVac} do sagui *Callithrix penicillata* se posicionam mais próximas dos vasos sanguíneos do que as demais espermatogônias

Buscando entender este posicionamento preferencial das espermatogônias-tronco em relação ao interstício/vasculatura, Kitadate e colaboradores (2018) demonstraram que, em roedores, células endoteliais secretam fatores mitogênicos como os FGFs, que difundem-se para o epitélio

seminífero, ficando em maior concentração nas regiões adjacentes ao interstício. Nestes locais, os FGFs se ligam a receptores específicos (FGFRs) nas SSCs, induzindo-as a autorenovação e migração para regiões mais afastadas (contato túbulo-túbulo). Ao se afastarem da região próxima ao interstício, a disponibilidade de FGFs diminui, acarretando na indução da diferenciação das espermatogônias-tronco. Em relação à espécie humana, não há informações sobre o posicionamento em nicho das espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas.

3.5 IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E ATIVIDADE FUNCIONAL DAS ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO COMO PERSPECTIVA PARA TERAPIAS CELULARES

O estudo de técnicas que se baseiam em células-tronco para restauração e/ou preservação da fertilidade cresceu substancialmente nos últimos anos devido a sua grande importância clínica (revisões em Sharma et al., 2019; Gul et al., 2020). A identificação, isolamento, expansão e posterior transplante de espermatogônias-tronco é, atualmente, a única técnica com elevado potencial de restauração da fertilidade endógena, permitindo a reprodução natural em animais experimentais (Brinster e Avarbock 1994; Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Hermann et al., 2012). Ademais, estes métodos permitem investigar o potencial de colonização (atividade-tronco) de uma espermatogônia, visto que, após o transplante, ela deverá ser capaz de colonizar e dar origem a um tecido renovado, em um ambiente afetado/modificado. Entretanto, para utilização desta técnica em humanos, pesquisadores esbarram em vários obstáculos, principalmente no fato de que, até o presente momento, não se sabe qual seria a verdadeira espermatogônia-tronco da espermatogênese.

Utilizando-se de roedores como modelo experimental, Brinster e colaboradores foram os primeiros a descrever, com sucesso, o autotransplante de SSCs (Brinster e Avarbrock 1994; Brinster e Zimmermann 1994). Subsequentemente, vários estudos foram publicados demonstrando o autotransplante como ferramenta para preservação da fertilidade e viabilização de gravidez, com prole saudável, em roedores e primatas não-humanos

(Brinster, 2007; Izadyar et al., 2003; Hermann et al., 2012; Wu et al., 2012). Por outro lado, em se tratando do transplante de espermatogônias indiferenciadas de primatas para roedores (xenotransplante), poucos trabalhos demonstraram sucesso na colonização espermatogonial, e aquelas que o fizeram, falharam na diferenciação e consequente produção de espermatozoides (Reis et al., 2000; Shami et al., 2020). Vários fatores podem explicar este insucesso como, por exemplo: diferenças filogenéticas entre doador e receptor, funcionalidade-tronco incompatível e números insuficientes de espermatogônias transplantadas.

Entretanto, apesar da não diferenciação em espermatozoides, o xenotransplante vem sendo empregado como metodologia padrão-ouro para caracterização das populações espermatogoniais do homem no que diz respeito a sua atividade-tronco, em associação com técnicas morfológicas e moleculares (Hermann et al., 2009; Valli et al., 2014; Shami et al., 2020; Tan et al., 2020). Neste sentido, estudos têm demonstrado potencial de colonização em espermatogônias de primatas que expressam os receptores de membrana: ITGA6, EpCAM, CD9 e SSEA4 (Maki et al., 2009; Izadyar et al., 2011; Zohni et al., 2012; Nickkholg et al., 2014). Recentemente, Shami et al. (2020) demonstraram que o marcador de espermatogônia indiferenciada primitiva TSPAN33 apresenta atividade-tronco bastante heterogênea. Todavia, a comparação com outras subpopulações de SSC e a identificação dos fenótipos que expressam estes marcadores se fazem necessários para uma melhor compreensão do potencial de célula-tronco das espermatogônias indiferenciadas do homem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE DOADORES

A coleta de testículos provenientes de doadores brasileiros foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (ETIC nº 032/04 e nº 117/07). Cinco pacientes do Setor de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), com câncer de próstata, que não foram submetidos a nenhum tratamento prévio contra o câncer, consentiram, em vida, através da assinatura de Termo de Responsabilidade e Livre Esclarecido, em doar seus testículos para este estudo.

Os pacientes selecionados apresentaram os seguintes parâmetros reprodutivos no momento da coleta: todos eram pais biológicos, apresentavam menos de 60 anos de idade (50 ± 10), possuíam parênquima testicular preservado e níveis séricos de hormônios sexuais normais (**Tabela 1**). Não há dados na literatura informando sobre possíveis efeitos negativos do câncer de próstata no processo espermatogênico. Dessa forma, os testículos dos respectivos pacientes foram considerados como normais.

Tabela 1. Parâmetros hormonais dos doadores brasileiros.

Hormônio	Doadores					VR
	1	2	3	4	5	
FSH (mUI/mL)	2,57	9,44	1,49	1,64	2,41	1,55 - 9,74
LH (mUI/mL)	3,91	4,42	4,18	3,83	3,68	0,82 - 6,22
TTB (ng/dL)	227	398	523	646	288	71,8 - 623

Legenda: FSH, hormônio folículo estimulante; LH, hormônio luteinizante; TTB, testosterona total basal; VR, valores de referência conforme a Vitros Imunodiagnostic®.

Testículos de dois doadores cadavéricos estadunidenses, de idade média 30 ± 10 anos, foram disponibilizados pela University of Pittsburgh Health Sciences Tissue Bank and Center for Organ Recovery, sob aprovação do Comitê de Ética da University of Pittsburgh nº CORID 686. As causas das mortes foram acidente de trânsito e ferimento a bala.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DOS TESTÍCULOS

4.2.1 *Processamento do material para análises morfofuncionais (histomorfometria e imunocoloração).*

Os testículos dos doadores brasileiros foram obtidos através da técnica de orquiectomia bilateral total, cirurgia realizada por médicos do HC-UFMG. Após remoção cirúrgica, os testículos de peso $22,2 \pm 2,7$ g foram cortados em pequenos fragmentos de 1-3mm de espessura, e foram fixados por imersão em diferentes fixadores de acordo com o processamento para análises morfométricas sob MLAR ou imunocoloração.

Em relação as análises morfométricas sob MLAR, os fragmentos testiculares foram fixados com glutaraldeído 5% (biological grade; Electron Microscopy Sciences, Hatfields, PA, EUA) em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,05M (pH 7,3), por 24 horas, pós-fixados em ósmio reduzido (tetróxido de ósmio 1% + ferrocianeto de potássio 1,5% em água destilada), desidratados em banhos crescentes de etanol (50-100%) e acetona, e incluídos em resina Araldite. Dos blocos de resina obtidos, cortes semifinos de $1\mu\text{m}$ foram seccionados e corados com azul de toluidina borato de sódio, conforme protocolo descrito anteriormente (Chiarini-Garcia et al., 2008)

Considerando as análises de imunohistoquímica (IHC) e imunofluorescência (IF), os fragmentos testiculares obtidos após a orquiectomia bilateral foram fixados por 24 horas com paraformaldeído 4% em PBS 0,05M (pH 7,3), desidratados em banhos crescentes de etanol (50-100%) e incluídos em Paraplast (parafina). Dos blocos de parafina obtidos, cortes de $5\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos e aderidos em lâmina silanizada para posterior processamento de imunocoloração.

4.2.2 *Processamento do material para citometria de fluxo e xenotransplante.*

Testículos dos pacientes estadunidenses, de peso $19,7 \pm 4,9\text{g}$, foram extraídos, após tempo de isquemia aproximado de seis horas, e checados quanto sua preservação anatomopatológica, com posterior transporte dos mesmos em solução lactada de Ringer, em gelo, para o laboratório. Em seguida, pequenos fragmentos ($\sim 2\text{cm}^2$) foram obtidos, imersos em meio de criopreservação (10% DMSO + 40% αMEM + 50% FBS) e mantidos em freezer a -80°C (CryoMed; Thermo Fischer Scientific). Posteriormente, as amostras foram estocadas em nitrogênio líquido até o dia da análise. Para realização dos experimentos, as amostras foram rapidamente descongeladas a 37°C , lavadas em meio essencial mínimo alpha (αMEM) + 10% soro fetal bovino (FBS), e digeridos enzimaticamente conforme descrito previamente por Hermann et al. (2009). Resumidamente, amostras de $2,0 \pm 0,5\text{g}$ foram inicialmente digeridas com Colagenase tipo IV, por 10 minutos, a 37°C , em agitador (250rpm), sedimentadas por centrifugação a 200xg , por 5 minutos, e lavadas com solução salina balanceada de Hank (HBSS, Gibco). Posteriormente, os túbulos seminíferos foram novamente digeridos com 0,25% de Tripsina/EDTA e DNase I, por aproximadamente 15 minutos. Paralisou-se a digestão através da adição FBS a 10%, com subsequente filtração das células em filtro de $70\mu\text{m}$ (Becton Dickinson). As células filtradas foram centrifugadas a 600xg , e o pellet obtido suspenso em meio αMEM + 10% FBS e quantificado em câmara de Neubauer, obtendo-se o valor de $35,3 \times 10^6 \pm 24,3 \times 10^6$ células testiculares, por grama de testículo.

4.3 OBTENÇÃO DOS CAMUNDONGOS

A utilização de camundongos nude imunodeficientes (NCr nu/nu; Taconic, Germantown, NY) para os experimentos de xenotransplante foi aprovada pelo Institutional Animal Care e Comitê de Uso Animal do Magee-Womens Research Institute, da University of Pittsburgh. Todos os procedimentos desenvolvidos neste estudo estão de acordo com as diretrizes para cuidado e uso animal da National Institute of Health, EUA (NIH) (aprovação # A3654-01).

4.4 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESPERMATOGÔNIAS SOB MICROSCOPIA DE LUZ DE ALTA RESOLUÇÃO

Inicialmente, baseando-se nas características morfológicas nucleares, as espermatogônias humanas foram separadas em quatro diferentes fenótipos: A_{escura} com vacúolo (A_{eVac}), A_{escura} sem vacúolo (A_{eNoVac}), A_{clara} e B. Para caracterização morfológica das respectivas espermatogônias, aproximadamente 50 células por fenótipo, considerando-se todos os doadores, foram analisadas sob objetiva de 100x, através do microscópio Olympus BX-51, acoplado a uma régua micrométrica. Características como: (a) tamanho e forma do núcleo; (b) tamanho e forma do vacúolo nuclear; (c) aparência e distribuição da cromatina (eucromatina e heterocromatina); e (d) quantidade de nucléolos foram descritas.

4.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO NÚCLEO E SEU RESPECTIVO VACÚOLO, NA ESPERMATOGÔNIA A_{EVAC} .

Para determinar o menor corte histológico em que o vacúolo nuclear pode ser observado em uma A_{eVac} , secções de 10 μm de espessura obtidas de material fixado em paraformaldeído e incluído em parafina foram utilizadas. Aproximadamente dez fotomicrografias foram obtidas em diferentes profundidades focais (de uma extremidade nuclear da A_{eVac} até a outra) sob microscopia de luz de contraste de fase, utilizando-se do microscópio Olympus BX-51) (**Fig. 6D, E, F, G e H**). Quando o vacúolo não era mais observado, o tamanho médio do núcleo (valor médio de dois eixos perpendiculares) foi determinado (**Figura 6D'-H'**) através do software Image-Pro Express (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA). Adicionalmente, a área e o volume que o vacúolo ocupam no núcleo da A_{eVac} foram determinados através de uma reconstrução 3D (Z-stack) a partir de cortes transversais de 10 μm de espessura, imunomarcados com antígeno específico para zona de rarefação da cromatina EXOSC10 (**Tabela 2**) (von Kopylow et al. 2012a) e corados com DAPI, para identificação nuclear (**Fig. 6J e K**). 25 A_{eVac} foram avaliadas, onde 100 fotomicrografias consecutivas de cada A_{eVac} foram obtidas em diferentes profundidades, com espaçamento entre 0,1 μm entre elas, utilizando-se de objetiva de 63x do microscópio Zeiss Apotome, do Centro de Aquisição e

Processamento de Imagens do ICB-UFMG (CAPI). A área e volume do núcleo e de seu vacúolo foram obtidos através da 'Medida Plugin Stack 'do Image J software (NIH, EUA).

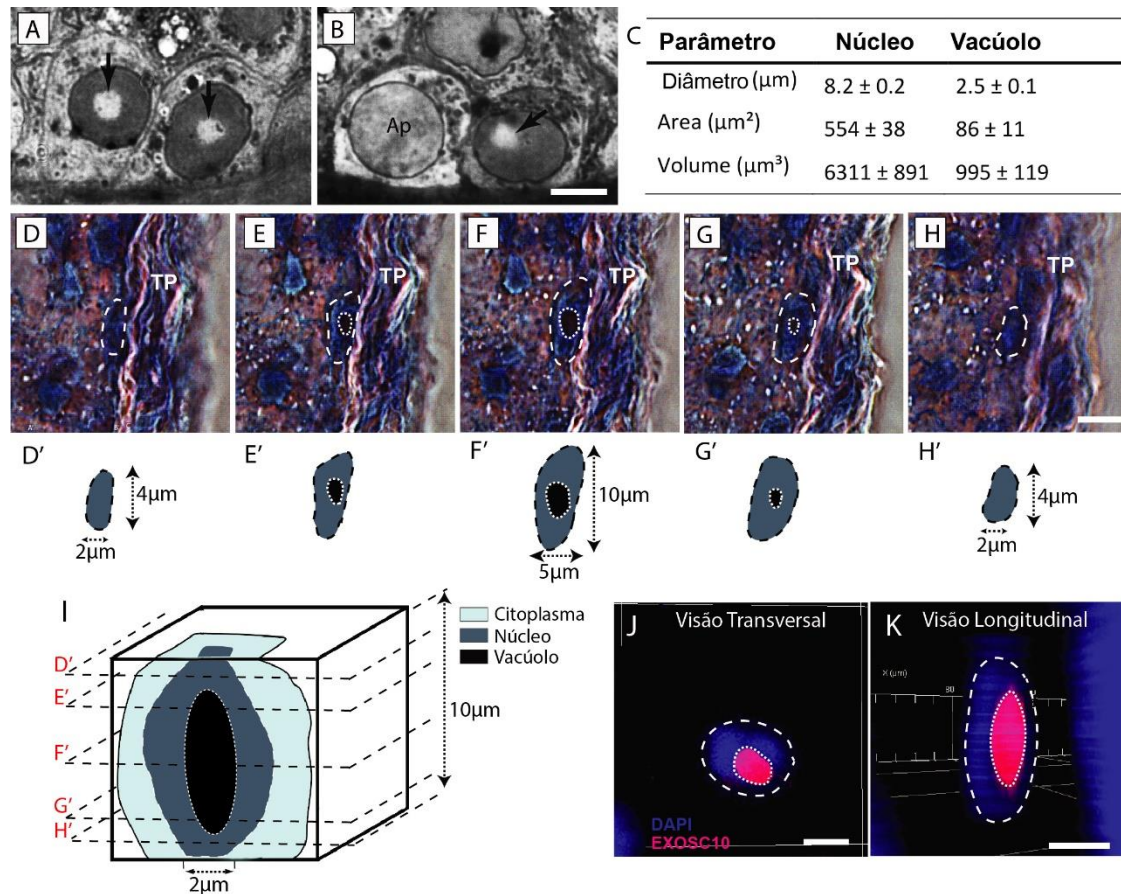


Figura 6. Descrição morfológica do núcleo e vacúolo nuclear da espermatogônia A_{eVac} . Fotomicrografias sob MLAR demonstrando a presença de (A) um vacúolo centralmente e (B) periféricamente localizados (setas). (C) Parâmetros morfológicos do núcleo e vacúolo nuclear (média \pm EPM). (D, E, F, G e H) Fotomicrografias em diferentes profundidades focais, sob contraste de fase, mostrando aspectos morfológicos da A_{eVac} . (D', E', F', G' e H') Ilustrações esquemáticas da espermatogônia A_{eVac} das figuras D-H, evidenciando o diâmetro médio de suas estruturas. (I) Reconstrução em 3D de uma secção de bloco de parafina, demonstrando que o vacúolo nuclear pode não ser observado em secções histológicas com espessura $\leq 3\mu\text{m}$ (D'-H', em vermelho). (J) Visão transversal e (K) longitudinal de uma espermatogônia A_{eVac} , através de reconstrução 3D Z-stack, com imunomarcacão e coloraçao para vacúolo (EXOSC10) e núcleo (DAPI), respectivamente. Legenda: Linha tracejada, delineamento do núcleo; linha pontilhada, delineamento do vacúolo; Ac, Aclara; TP, túnica própria. Barras: $10\mu\text{m}$.

4.6 POPULAÇÃO ESPERMATOGONIAL, NÚMERO DE MITOSES E APOPTOSES (CINÉTICA ESPERMATOGONIAL), SOB MLAR.

A quantificação da população, número de mitoses e apoptoses espermatogoniais no ciclo do epitélio seminífero (CES) do homem, levou em consideração a classificação de VI estádios, descrita inicialmente por Clermont Y. (1963), posteriormente reavaliada por Nihi et al. (2017), sob MLAR. Para tal, os fenótipos espermatogoniais A_{eVac} , A_{eNoVac} , A_{clara} , B e os espermatócitos em preleptóteno (PI) foram quantificados, totalizando 450 células avaliadas por doador. Cortes transversais de células que apresentavam diâmetro nuclear menor ou igual a $3\mu m$, não foram quantificados (**Figura 6**) para evitar a identificação errônea dos fenótipos celulares. A quantificação obtida para cada célula germinativa foi normalizada pela espessura do corte e diâmetro nuclear, conforme fórmula descrita por Abercrombie (1946) e corrigida por Amann (1962). Ademais, o número de nucléolos de célula de Sertoli (NCS) também foi quantificado e corrigido da mesma maneira. Por fim, o número de espermatogônias e PI contados foi equalizado em relação a 100 NCS, em cada um dos seis estádios do CES.

Em relação a quantificação de mitoses e apoptoses espermatogoniais, aproximadamente 30 cortes transversais de túbulos seminíferos foram avaliados, por doador, onde figuras de mitose e apoptose presentes na membrana basal do epitélio seminífero foram contadas. Posteriormente, o número de NCS também foi determinado para equalização dos valores de mitose e apoptose obtidos. Não foi possível distinguir a que tipo celular as figuras mitóticas e apoptóticas pertenciam, uma vez que a morfologia nuclear é semelhante entre elas. Dessa forma, os números obtidos correspondem a soma de todas as células presentes na membrana basal do epitélio seminífero que passavam por mitose ou apoptose, em cada um dos seis estádios do CES. Todas as análises referentes à cinética espermatogonial foram realizadas sob objetiva de 100x.

4.7 AVALIAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS POR IMUNOCOLORAÇÃO.

Todas as análises de imunocoloração foram realizadas utilizando-se material fixado com paraformaldeído, incluído em parafina (paraplast) e seccionado a 5µm de espessura. Inicialmente, as amostras foram desparafinizadas com xilol, hidratadas em banhos decrescentes de etanol (100-70%) com subsequente recuperação antigênica por imersão em solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0), sob aquecimento em micro-ondas (potência 70%), por 30 minutos. Controles negativos foram obtidos por omissão do anticorpo primário.

4.7.1 *Imunohistoquímica*

Para análises de imunocoloração utilizando-se da peroxidase, após recuperação antigênica, realizou-se inibição da peroxidase endógena aplicando-se solução de metanol em peróxido de hidrogênio 3%, por 10 minutos, sobre os cortes. Posteriormente, as amostras foram submetidas a bloqueio de avidina e biotina endógena utilizando-se de Kit da Vector Laboratories, com subsequente bloqueio de ligações inespecíficas com soro de cabra 10% (Vector Laboratories) e incubação com anticorpos primários (Tabela 2), por 12 horas, a 4°C, em câmara úmida. Logo após, as seguintes etapas foram realizadas, respectivamente: incubação com anticorpos secundários biotinilados (BA-1000, *Goat anti-mouse*; e BA-9200, *Goat anti-rabbit*, da Vector Laboratories) por 60 minutos; sensibilização com Estreptavidina (Abcam), por 30 minutos; revelação da reação com solução de DAB (Vector Laboratories); contra-coloração com Hematoxilina de Harris; desidratação com banhos crescentes de etanol (70-100%); clareamento com xilol; e montagem das lâminas.

Para análises de imunofluorescência, subsequente à recuperação antigênica, as amostras foram submetidas a bloqueio de ligações inespecíficas em solução de soro animal 10% (cabra ou mula, dependendo do anticorpo secundário a ser utilizado) com BSA 1%, por 30 minutos, para posterior incubação com anticorpos primários (**Tabela 2**), por 12 horas, a 4°C, em câmara úmida. Após incubação dos cortes com anticorpos secundários (**Tabela 3**), por 30 minutos, as amostras foram coradas com DAPI para posterior avaliação. Em

se tratando de dupla ou tripla imunomarcação, nos casos em que um dos anticorpos primários a ser utilizado não fosse produzido em *goat*, realizou-se a incubação dos anticorpos de uma única vez, misturando-se todos os anticorpos primários em uma única solução. Caso contrário, a incubação dos respectivos anticorpos procedeu-se em dias consecutivos, perfazendo a revelação de cada anticorpo primário, por vez. Esta forma de processamento ocorreu devido ao fato de que todos os anticorpos secundários *anti-mouse* e *anti-rabbit* utilizados foram produzidos em *goat* (**Tabela 3**). Dessa forma, a incubação simultânea de anticorpos primários produzidos em *goat* com os outros anticorpos levaria a reações cruzadas, uma vez que os anticorpos secundários *anti-goat* reagiriam não somente com o anticorpo primário em questão, mas também com os outros anticorpos secundários produzidos em *goat*.

Tabela 2. Dados sobre os anticorpos primários utilizados nas análises histomorfométricas de imunohistoquímica.

Anticorpo	Código	Isotipo	Hospedeiro	Clonalidade	Diluição
MCM7	ab2360	IgG	<i>Mouse</i>	Monoclonal	1:200
MCM7	ab52489	IgG	<i>Rabbit</i>	Monoclonal	1:100
UTF1	mab4337	IgG	<i>Mouse</i>	Monoclonal	1:200
EXOSC10	ab50558	IgG	<i>Rabbit</i>	Policlonal	1:50
EXOSC10-AF647	Sc-374595	IgG	<i>Mouse</i>	Monoclonal	1:50
GFRA1	Sc-271546	IgG	<i>Mouse</i>	Monoclonal	1:200
GFRA1	Sc-6157	IgG	<i>Goat</i>	Policlonal	1:25
KIT	Sc-1494	IgG	<i>Goat</i>	Policlonal	1:50
KIT	AF332	IgG	<i>Goat</i>	Policlonal	1:20
TSPAN33	14329-1-AP	IgG	<i>Rabbit</i>	Policlonal	1:50

Tabela 3. Dados sobre os anticorpos secundários utilizados nas análises de imunofluorescência.

Anticorpo	Código	Isotipo	Hospedeiro	Reatividade
Alexa Fluor 488	A11001	IgG	Goat	Mouse
Alexa Fluor 488	A11008	IgG	Goat	Rabbit
Alexa Fluor 555	A21422	IgG	Goat	Mouse
Alexa Fluor 555	A21428	IgG	Goat	Rabbit
Alexa Fluor 555	A21244	IgG	Donkey	Goat
Alexa Fluor 647	A21235	IgG	Goat	Mouse
Alexa Fluor 647	A21244	IgG	Goat	Rabbit

4.8 PROLIFERAÇÃO ESPERMATOGONIAL POR IMUNOMARCAÇÃO DO ANTÍGENO MCM7.

Após imunohistoquímica para identificação do antígeno nuclear MCM7, aproximadamente 400 espermatogônias por doador foram identificadas e quantificadas. O vacúolo da A_{eVac} é facilmente visualizado em material incluído em parafina, o que permitiu a sua fácil identificação. Devido a reação positiva do DAB com os núcleos espermatogoniais MCM7+, a distinção entre as espermatogônias A_{eNoVac} e A_{clara} ocorreu conforme demonstrado na **Figura 7**.

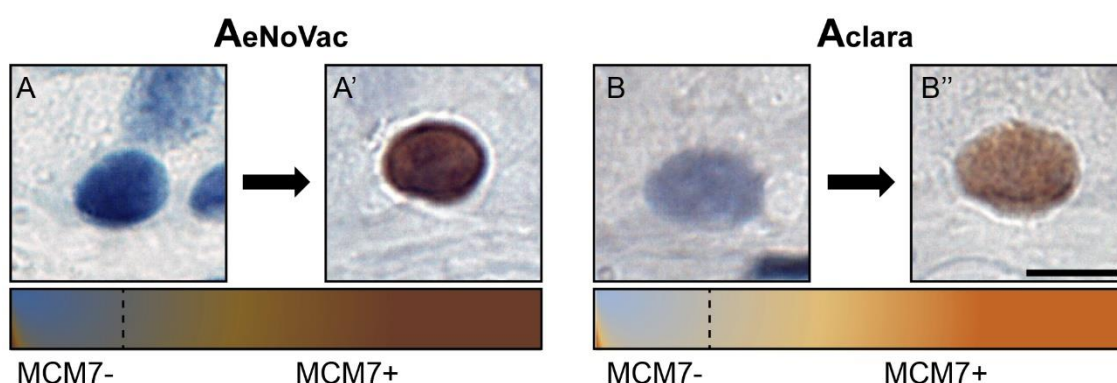


Figura 7. Metodologia aplicada para diferenciação morfológica entre as espermatogônias A_{eNoVac} e A_{clara} quando negativas (A e B) ou positivas (A' e B'') para o marcador de proliferação espermatogonial MCM7. Observe que, para cada uma das espermatogônias, há uma variação gradativa entre a coloração azulada dos núcleos MCM7- (porção à esquerda das barras de coloração sob as fotomicrografias) para uma coloração amarronzada, com diferentes tonalidades, dependendo da intensidade da expressão do MCM7. As linhas tracejadas sobre as barras de coloração determinam a linha de corte entre o que foi considerado uma espermatogônia MCM7- para MCM7+. Barra: 10µm.

Por apresentarem tamanho e morfologias similares em material incluído em parafina, as espermatogônias do tipo B e os espermatócitos em PI foram agrupados (B-PI). Empregando-se do software Image-Pro Express, a membrana basal dos túbulos seminíferos em que as espermatogônias foram quantificadas era dimensionada, após ser fotografada pela câmera QColor 3 acoplada ao microscópio BX51. Posteriormente, o número das espermatogônias identificadas foi equalizado por milímetro de membrana basal. A taxa de proliferação celular para cada fenótipo foi obtida conforme fórmula abaixo:

$$\frac{(N^{\circ} \text{ espermatogônia MCM7+})}{(N^{\circ} \text{ espermatogônia MCM7+}) + (N^{\circ} \text{ espermatogônia MCM7-})} \times 100$$

4.9 POSICIONAMENTO ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO AO VASO SANGUÍNEO MAIS PRÓXIMO (NICO ESPERMATOGONIAL).

Para avaliação do nicho espermatogonial, empregou-se método similar ao utilizado por Caldeira-Brant et al. (2018). Entretanto, no presente trabalho, também avaliou-se a distância das espermatogônias quiescentes (MCM7-) e em proliferação mitótica (MCM7+), em relação ao vaso sanguíneo mais próximo (vênula ou capilar). Resumidamente, 20 fotomicrografias do parênquima testicular de amostras processadas para MLAR e imunomarcação para o antígeno MCM7 foram obtidas, por doador, sob objetiva de 20x, de forma que pudessem ser observados o epitélio seminífero e o interstício, ao mesmo tempo. Após identificação de aproximadamente 400 espermatogônias, por doador, determinou-se a distância de cada uma delas para o vaso sanguíneo mais próximo, utilizando-se do programa Image-Pro Express (**Figura 8**).

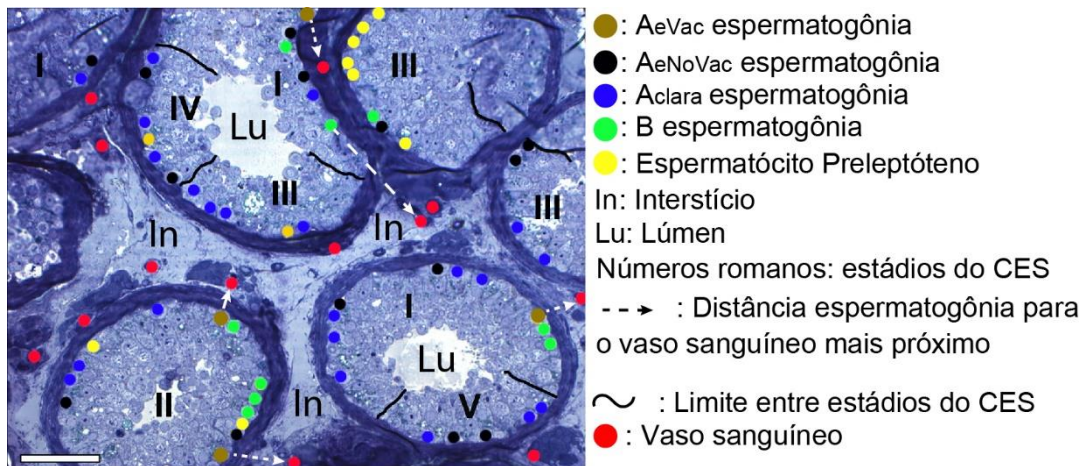


Figura 8. Metodologia empregada para determinar a distância entre os diferentes fenótipos espermatogoniais e o espermatócito em preleptóteno para o vaso sanguíneo mais próximo. Barra: 100 μ m.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES ESPERMATOGONIAIS EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE MARCADORES ESPECÍFICOS, ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.

Considerando que para as análises de imunofluorescência não foi possível identificar com precisão os diferentes fenótipos espermatogoniais através da coloração com DAPI e que somente as AeVac foram (devido a evidente zona de rarefação na cromatina), os outros tipos de células germinativas sobre a membrana basal do epitélio seminífero precisaram ser agrupados. Dessa forma, as células foram divididas em (a) AeVac; (b) Outras Spg (que não as AeVac), para as análises relacionadas a expressão de UTF1 e GFRA1; e (c) Outras Spg-PI, para aquelas análises em relação ao c-KIT, uma vez que espermatócitos em fase inicial também expressam este receptor (Di Persio et al. 2017). Os cálculos da taxa de proliferação celular (MCM7) foram obtidos conforme fórmula supracitada no tópico 4.8.

4.10.1 Avaliação das populações de espermatogônias em relação à expressão de UTF1, GFRA1, c-KIT e TSPAN33

No que se refere às análises imunofluorescentes dos marcadores UTF1, GFRA1 e c-KIT, quantificou-se aproximadamente 250 células situadas sobre a membrana basal do epitélio seminífero, por paciente e por anticorpo avaliado.

Por outro lado, para caracterização da população de TSPAN33, um total de 500 células foram contadas por doador (n=3). Para todos os anticorpos, o número total de células quantificadas foi equalizado por milímetro de membrana basal do comprimento dos túbulos seminíferos, exatamente onde as células germinativas foram contadas. Esta análise foi realizada através do software Image-Pro Express.

4.10.2 Quantificação da expressão de UTF1 através da intensidade de fluorescência.

Para quantificar a taxa de expressão de UTF1 através da intensidade da fluorescência, aproximadamente 50 células UTF1+ (A_{eVac} e Outras Spg) foram fotografadas, por doador (n=3). Utilizando-se do programa Image J (NIH), o canal da imagem referente ao filtro do UTF1 foi transformado em imagem preto e branco e o núcleo de cada célula delineado. Posteriormente, obteve-se o valor médio da intensidade da fluorescência de UTF1 para as A_{eVac} e para Outras Spg (*mean gray value*), onde 100% representa a intensidade máxima (branco) e 0% a mínima (preto). Todas as fotomicrografias foram obtidas empregando-se o mesmo microscópio (Nikon Eclipse Ti, do CAPI-UFMG), sob mesma objetiva (40x) e tempo de exposição.

4.11 IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO ESPERMATOGONIAL TSPAN33 VIA IMUNOHISTOQUÍMICA.

Após reação imunohistoquímica para o antígeno TSPAN33 (receptor de membrana) foram identificados os diferentes tipos espermatogoniais que o expressam, o que não foi possível após a imunofluorescência (item 4.10.1). Para quantificação, aproximadamente 400 espermatogônias foram quantificadas por doador (n=3) e classificadas quanto ao fenótipo (A_{eVac} , A_{eNoVac} , A_{clara} e B) e expressão de TSPAN33 (positiva ou negativa). Posteriormente, a população obtida para cada espermatogônia foi equalizada por milímetro de membrana basal, como descrito no item 4.10.1.

4.12 ISOLAMENTO DAS ESPERMATOGÔNIAS VIA CITOMETRIA DE FLUXO ATIVADA POR FLUORESCÊNCIA.

A citometria de fluxo ativada por fluorescência (FACS) foi utilizada para o isolamento das espermatogônias TSPAN33+, visando posterior estudo de seu potencial de célula-tronco via xenotransplante. Para realização desta citometria, as suspensões de células testiculares provenientes de dois doadores foram aliqüotadas da seguinte forma: (a) alíquota que não recebeu adição de anticorpos (células germinativas não-triadas) e (b) outra incubada com anticorpos (espermatogônias triadas), conforme esquema demonstrado na **Figura 9A-B**. Para comparação do potencial de transplante das espermatogônias TSPAN33+, utilizou-se outro conhecido marcador humano que isola espermatogônias-tronco com elevado potencial de colonização após transplante, o SSEA4 (Izadyar et al., 2011; Guo et al., 2018). Desse modo, a alíquota foi incubada com ambos os anticorpos: anti-TSPAN33 (conjugado com PE; R&D Systems, FAB8505P025) e anti-SSEA4 (conjugado com AF488; Invitrogen, 53-8843-41), ambos na concentração de $5\mu\text{L}/10^6$ células (**Fig. 9B**). Para melhorar a sensibilidade da compensação e isolamento das células positivas para os respectivos anticorpos, foram adicionadas gotas de compensação (OneComp EBeads, Invitrogen). Em ambas as alíquotas, com e sem adição de anticorpos, adicionou-se $0,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídio (Thermo Fischer) para identificação e separação de células vivas das mortas durante a FACS, realizada no equipamento BD FACSAria II (BD Biosciences). O delineamento (*gating*) das subpopulações foi estabelecido com base no nível de expressão dos marcadores (TSPAN33-PE e SSEA4-AF488), bem como a eliminação de células mortas coradas com iodeto de propídio e exclusão de células que exibem ligação não específica ou autofluorescência. Os gráficos correspondentes à compensação e isolamento das espermatogônias podem ser observados na **Figura 9C** e o número de espermatogônias isoladas (transplantadas), por grupo, nas **Tabelas 3 e 4**. A taxa de células viáveis obtida após citometria de fluxo foi de $57,1 \pm 5,9\%$.

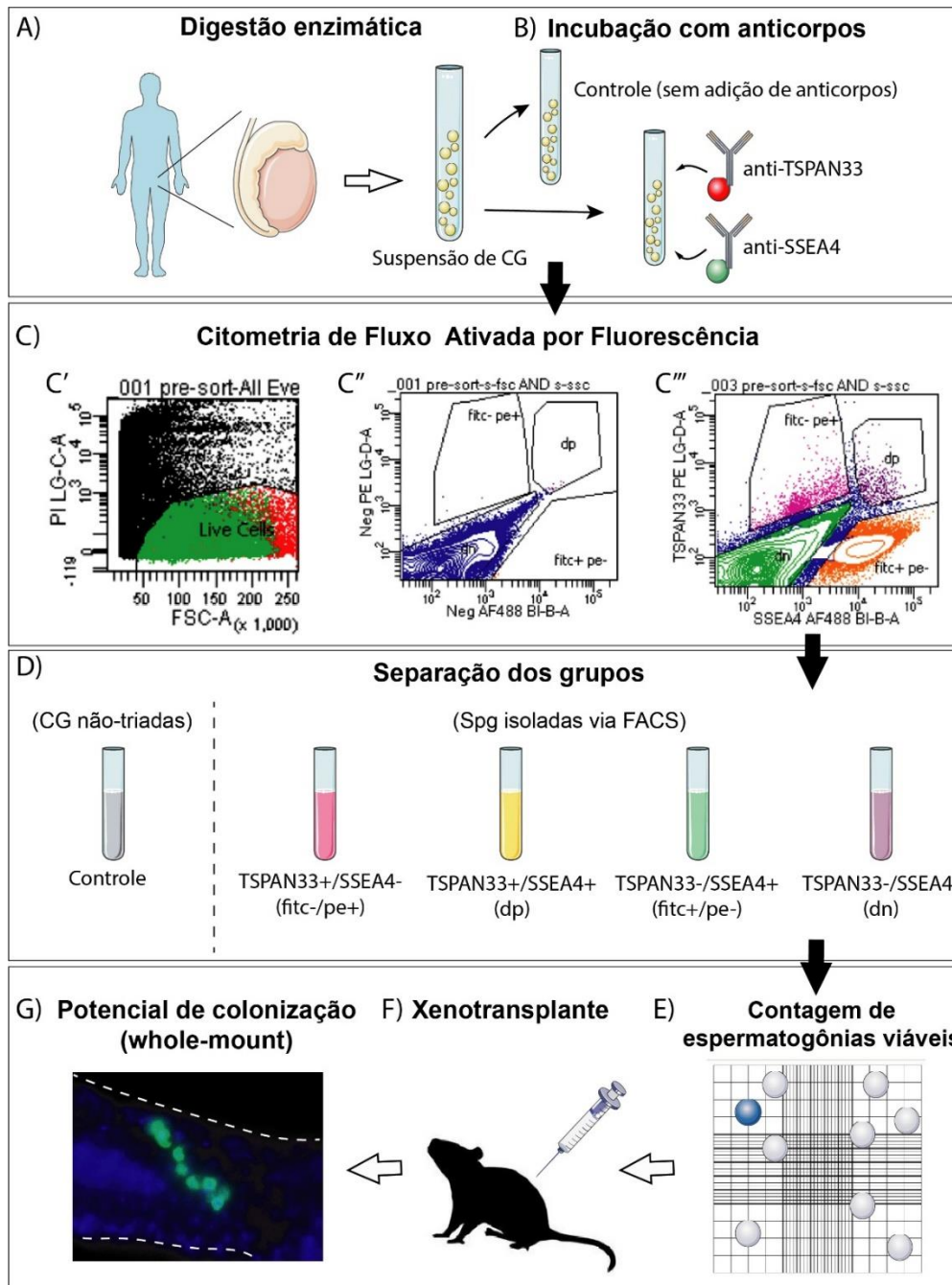


Figura 9. Processamento das amostras testiculares referentes à realização da citometria de fluxo ativada por fluorescência e xenotransplante. Suspensões de células testiculares (A) foram enzimaticamente digeridas, incubadas ou não com anticorpos (B) e enviadas para FACS (C). Triagem das células mortas (PI+). (C') Identificação do controle negativo (TSPAN33-/SSEA4-). (C'') Triagem das quatro subpopulações (Db; TSPAN33-/SSEA4-; fitc-/pe+, TSPAN33+/SSEA4-; fitc+/pe-; TSPAN33-/SSEA4+; e dp, TSPAN33+/SSEA4+). (D) Cinco diferentes suspensões celulares (grupos) utilizadas (CG, células germinativas). Dessas cinco alíquotas, quantificou-se as células vivas (E), realizou-se o xenotransplante (F) e a determinação do potencial de colonização de cada população transplantada (G).

4.13 PREPARO DOS ANIMAIS E XENOTRANSPLANTE.

4.13.1 *Preparação dos animais*

23 camundongos nude imunodeficientes (NCr nu/nu), com 5-6 semanas de idade, foram tratados com o agente quimioterápico Bussulfano (Sigma), diluído em solução salina e injetado via intravenosa para eliminação da espermatogênese endógena (40mg/kg). Seis semanas após o tratamento com Bussulfano (animais aproximadamente com 10-12 semanas de idade), foi realizado o xenotransplante.

4.13.2 *Xenotransplante*

Após obtenção das suspensões celulares através da FACS, no mesmo dia, as amostras foram ressuspensas em meio α MEM contendo FBS 10% e azul de Trypan 10% (Invitrogen). Antes da realização do xenotransplante, separou-se pequeno volume da suspensão celular de cada uma dos grupos para quantificação do número de células viáveis, em câmara de Neubauer (**Fig. 9E**), obtendo-se os valores demonstrados nas **Tabelas 4 e 5**. Posteriormente, 7 μ L de suspensão celular, de cada grupo, foram injetados nos testículos dos camundongos, via ductos eferentes, de forma aleatória, conforme previamente descrito por Ogawa et al. (1997) e gravado por Medrano et al. (2014). Resumidamente, após anestésiar os camundongos com Isoflurano 5%, via inalação, posicionou-se os em mesa cirúrgica sob microscópio de dissecação (Nikon SMZ1000), fez-se uma incisão de 1cm de comprimento no abdômen para retirada do conteúdo testicular (testículo + epidídimo), e posicionou-se os órgãos sobre papel estéril em V. Subsequentemente, dissecou-se a região dos ductos eferentes através da remoção do excesso de tecido adiposo na região e injetou-se 7 μ L de suspensão celular, através de agulhas de vidro (70 μ m de diâmetro) acopladas a equipamento de micro-injeção (Femtojet, Eppendorf), sob pressão de 160hPa. Após observar que aproximadamente 60-70% do conteúdo testicular foi preenchido com solução azulada (Trypan), as gônadas foram reposicionadas intracorporalmente e a incisão suturada. Os animais foram mantidos em local aquecido até completa recuperação.

Tabela 4. Dados referentes às amostras utilizadas no xenotransplante de espermatogônias humanas: células não triadas, TSPAN33+/SSEA4- e TSPAN33+/SSEA4+ para os camundongos imunodeficientes.

Grupo	Nº doador (homem)	Nº receptor (camundongo)	Testículo transplantado	Volume alíquota (µL)	Nº células transplantadas	Nº cél. viáveis transplantadas	Concentração cél. injetadas/mL)	Peso testículo (mg)
Células germinativas não-triadas (?)	1	7	TE	7	220.500	216.972	31,5 x 10 ⁶	36,72
	1	8	TE	7	220.500	216.972	31,5 x 10 ⁶	32,72
	1	8	TD	7	220.500	216.972	31,5 x 10 ⁶	45,04
	1	9	TE	7	220.500	216.972	31,5 x 10 ⁶	63,93
	1	10	TD	7	220.500	216.972	31,5 x 10 ⁶	46,20
	2	16	TE	7	126.000	122.200	18,0 x 10 ⁶	28,98
	2	18	TE	7	126.000	122.200	18,0 x 10 ⁶	29,67
	2	19	TD	7	126.000	122.200	18,0 x 10 ⁶	49,40
TSPAN33+ /SSEA4-	1	4	TE	7	11.550	11.204	1,7 x 10 ⁶	38,02
	1	5	TE	7	11.550	11.204	1,7 x 10 ⁶	31,25
	1	6	TE	7	11.550	11.204	1,7 x 10 ⁶	36,90
	2	18	TD	7	1.400	1.400	0,2 x 10 ⁶	27,08
	2	19	TE	7	1.400	1.400	0,2 x 10 ⁶	55,50
TSPAN33+ /SSEA4+	1	2	TE	7	4.550	4.550	0,7 x 10 ⁶	35,08
	1	3	TE	7	4.550	4.550	0,7 x 10 ⁶	25,38
	2	20	TD	7	5.733	5.773	0,8 x 10 ⁶	35,65
	2	21	TD	7	5.733	5.773	0,8 x 10 ⁶	39,39

Legenda: TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo

Tabela 5. Dados referentes às amostras utilizadas no xenotransplante de espermatozônias humanas TSPAN33-/SSEA4+ e TSPAN33-/SSEA4- para os camundongos imunodeficientes.

Grupo	Nº doador (homem)	Nº receptor (camundongo)	Testículo transplantado	Volume alíquota (μL)	Nº células transplantadas	Nº cél. viáveis transplantadas	Concentração cél. injetadas/mL)	Peso testículo (mg)
TSPAN33-/SSEA4+	1	4	TD	7	42.000	40.236	$6,0 \times 10^6$	31,25
	1	5	TD	7	42.000	40.236	$6,0 \times 10^6$	38,40
	1	6	TD	7	42.000	40.236	$6,0 \times 10^6$	41,01
	1	7	TD	7	42.000	40.236	$6,0 \times 10^6$	40,81
	2	11	TD	7	86.800	86.541	$12,4 \times 10^6$	32,49
	2	12	TD	7	86.800	86.541	$12,4 \times 10^6$	42,16
	2	13	TE	7	86.800	86.541	$12,4 \times 10^6$	33,63
	2	21	TE	7	86.800	86.541	$12,4 \times 10^6$	71,27
TSPAN33-/SSEA4-	2	22	TE	7	86.800	86.541	$12,4 \times 10^6$	39,12
	1	1	TD	7	907.200	907.200	$129,6 \times 10^6$	34,74
	1	1	TE	7	907.200	907.200	$129,6 \times 10^6$	36,83
	1	2	TD	7	907.200	907.200	$129,6 \times 10^6$	38,53
	1	3	TD	7	907.200	907.200	$129,6 \times 10^6$	26,88
	2	14	TE	7	518.000	507.640	$74,0 \times 10^6$	34,57
	2	15	TD	7	518.000	507.640	$74,0 \times 10^6$	29,05
	2	16	TD	7	518.000	507.640	$74,0 \times 10^6$	29,35
2	17	TE	7	518.000	507.640	$74,0 \times 10^6$	42,77	

Legenda: TD, testículo direito; TE, testículo esquerdo.

4.14 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSPLANTE E COLONIZAÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS HUMANAS VIA IMUNOMARCAÇÃO POR *WHOLE-MOUNT*.

4.14.1 *Imunofluorescência por whole-mount.*

Oito semanas após o xenotransplante, os testículos dos camundongos foram extraídos, removeu-se a túnica albugínea, e os túbulos seminíferos foram gentilmente separado com auxílio de uma pinça. Subsequentemente, o tecido foi digerido com 1mg/mL de DNase I e 1mg/mL de Colagenase IV, por 10 minutos, em solução salina balanceada de Hank, a 37°C, com posterior fixação em paraformaldeído a 4%, por 2 horas. Em seguida, posicionou-se os túbulos seminíferos em placas de rede de 12 poços contendo PBS (0,05M), lavou-se com banhos crescentes de metanol (MeOH) em PBS (25-100%) e incubou-se em solução de MeOH/DMSO/H₂O₂, por 3 horas. Posteriormente, o tecido foi reidratado em soluções decrescentes de MeOH/PBS (50-25%), permeabilizado e bloqueado para ligações inespecíficas em solução de leite em pó desnatado 2% (*Blotto dry milk powder*)/Triton X-100 5%, em PBS, por 60 minutos, e incubado com anticorpo primário *rabbit anti-primate* (Hermann et al., 2007), na diluição de 1:800, por 12 horas, a 4°C. Após sucessivas lavagens com PBS, incubou-se os túbulos seminíferos com anticorpo secundário *Goat anti-rabbit* Alexa Fluor 488 (Invitrogen), por 12 horas, a 4°C, com subsequente dispersão dos mesmos em lâmina. Em seguida, as lâminas foram preparadas com solução de montagem contendo DAPI (Vectashield DAPI mounting media). Cada lâmina preparada continha todo o conteúdo de túbulos seminíferos extraídos de um único testículo, de um camundongo.

4.14.2 *Quantificação das espermatogônias humanas no testículo dos roedores após xenotransplante.*

Para identificação e quantificação das espermatogônias humanas dos diferentes grupos celulares transplantados (controle, TSPAN33+/SSEA4-, TSPAN33+/SSEA4+, TSPAN33-/SSEA4+ e TSPAN33-/SSEA4-), todos os túbulos seminíferos presentes na lâmina foram avaliados. Somente espermatogônias com morfologia típica (núcleo redondo ou ovalado, com

elevada proporção de tamanho entre núcleo/citoplasma) foram contabilizadas, conforme descrito por Valli et al. (2014). Após quantificação das mesmas, o número total obtido foi equalizado pelo número de espermatogônias viáveis transplantadas, em cada animal e grupo celular avaliado.

Considerando que as células germinativas masculinas mantêm-se conectadas na forma de correntes/sincícios após incompleta divisão mitótica das espermatogônias, investigou-se a forma como as colônias espermatogoniais se apresentavam. Verificou-se que se dispunham na forma de: células isoladas, células pareadas (duas células unidas por uma ponte intracitoplasmática) e células alinhadas (cadeias contendo mais de três espermatogônias). Esta disposição é relevante uma vez que quanto maior o sincício, maior a probabilidade de existirem células avançadas do processo espermatogênico (Valli et al., 2014; Di Persio et al. 2017). Dessa forma, calculou-se a porcentagem média de organização das colônias, dentre o total de espermatogônias quantificadas em cada um dos cinco grupos celulares avaliados.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros neste estudo foram testados para normalidade previamente a análise utilizando-se do procedimento do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute, 2001). Os dados foram analisados como não randomizados, através do procedimento de modo linear geral, do SAS. As análises foram estabelecidas via múltiplas comparações aplicando-se o teste de probabilidade da diferença entre as médias (pdiff). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M), com exceção dos gráficos relacionados a população espermatogonial por milímetro de membrana basal, representados pelos valores brutos de cada paciente \pm desvio padrão da média (D.P.M).

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DOS DIFERENTES FENÓTIPOS ESPERMATOGONIAS.

Empregando-se a técnica de microscopia de luz de alta resolução, aspectos morfológicos nucleares das espermatogônias foram descritos e serviram de base para distinção entre os fenótipos: A_{eVac} , A_{eNoVac} , A_{clara} e B, conforme demonstrado na **Figura 10**. Não foram observadas alterações fenotípicas estágio-específicas.

Espermatogônia A escura com vacúolo (A_{eVac}): Núcleo ovalado, de diâmetro médio $8,3 \pm 1,2\mu\text{m}$, apresentando eucromatina densa, raros ou ausente focos de heterocromatina, nucléolos (1-2) posicionados em contato ou próximos do envoltório nuclear e presença de evidente zona de rarefação na cromatina (vacúolo), posicionada central ou periféricamente (**Figura 10A**).

Espermatogônia A escura sem vacúolo (A_{eNoVac}): Núcleo ovalado, de diâmetro médio $8,2 \pm 1,1\mu\text{m}$, apresentando eucromatina bem corada, raros ou ausente focos de heterocromatina, nucléolos (1-2) posicionados em contato ou próximos do envelope nuclear e ausência de vacúolo (**Figura 10B**).

Espermatogônia A clara (A_c): Núcleo ovalado ou redondo, de diâmetro médio $9,2 \pm 1,3\mu\text{m}$, apresentando eucromatina fracamente corada, raros focos de heterocromatina, nucléolos irregulares (1-2) posicionados em contato ou próximos do envelope nuclear (**Figura 10C**).

Espermatogônia do tipo B (B): Núcleo redondo, de diâmetro médio $8,4 \pm 1,3\mu\text{m}$, apresentando eucromatina manchada, às vezes em grumos, com focos de heterocromatina aleatoriamente distribuídos pelo núcleo, nucléolos evidentes (1-3) posicionados próximos ou afastados do envelope nuclear (**Figura 10D**).

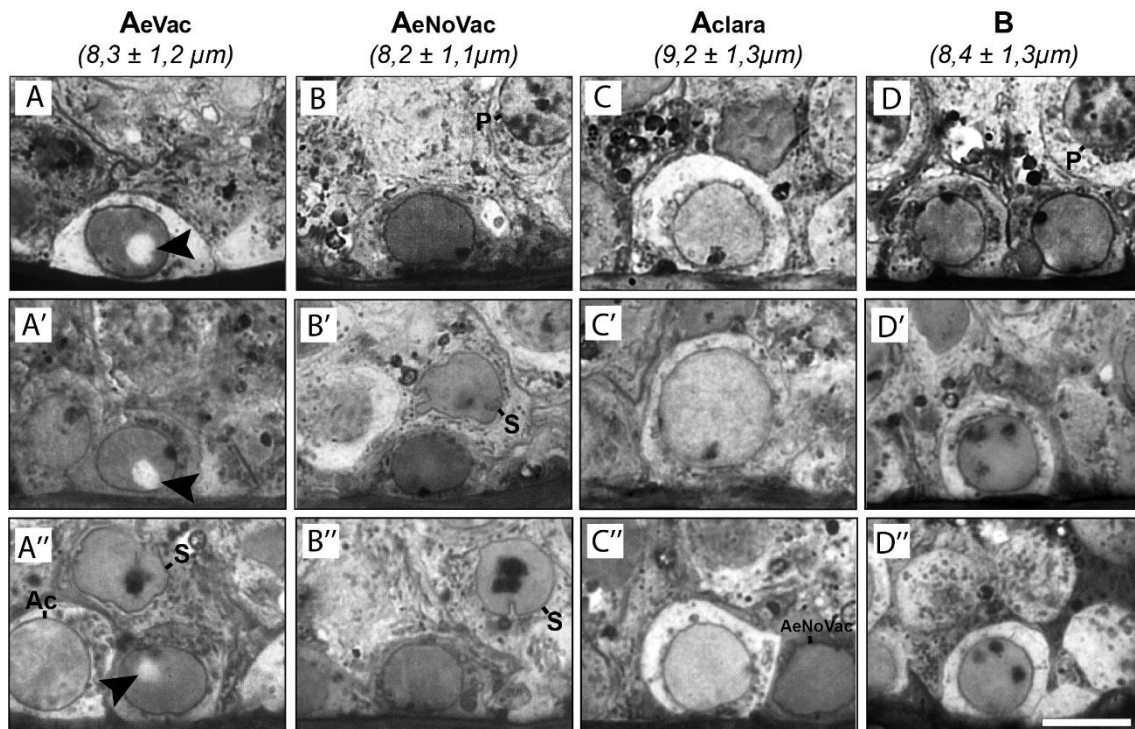


Figura 10. Aspectos morfológicos dos diferentes fenótipos espermatogoniais do homem: A_{eVac} (A-A''), A_{eNoVac} (B-B''), A_{clara} (C-C'') e B (D-D''), sob MLAR. Valores entre parênteses, diâmetro nuclear (média \pm EPM); Cabeça de seta, vacúolo nuclear; Ac, Aclara; S, célula de Sertoli; P, espermátocito em paquíteno. Barra: 10 μ m.

5.2 CINÉTICA ESPERMATOGONIAL

Com base na identificação morfológica, o número dos quatro diferentes fenótipos espermatogoniais foi determinado ao longo dos estádios do CES, visando descrever a cinética espermatogonial. Independente dos estádios do CES e em números totais, a espermatogônia A_{eVac} apresentou-se como a menor população, representando 10% das espermatogônias humanas ($P < 0,05$), ao passo que as A_{eNoVac} corresponderam a 22% (**Fig. 11A**). Por outro lado, enquanto a A_{clara} mostrou-se como a maior população espermatogonial ($P < 0,05$), representando 40% do total, a espermatogônia diferenciada do tipo B representou 28% das células da fase proliferativa.

Ao analisar a população espermatogonial separadamente ao longo de cada um dos seis estádios do CES, observou-se que a espermatogônia A_{eVac} apresentou menores valores e pouca variabilidade, sendo a menor população nos estádios V e VI ($P < 0,05$), como pode ser observado na **Figura 11B**. Embora

a A_{eNoVac} mostrou números similares a A_{eVac} na maioria dos estádios do CES ($P > 0,05$; I-IV), sua população foi mais variável decrescendo entre os estádios VI-III e aumentando progressivamente em seguida. Apesar das A_{claras} serem encontradas em maior número em todos os estádios do CES em comparação com as A_{eNoVac} , sendo em alguns deles de forma significativa (I-II, IV-V; $P < 0,05$), ambas mostraram a mesma tendência de variação ao longo do ciclo (**Fig. 11B**). Esta variação populacional das espermatogônias A_{eNoVac} e A_{clara} ao longo do CES está em sincronismo com o aumento e redução da população de espermatogônias diferenciadas do tipo B (**Fig. 11B-C**). Quando os números de A_{eNoVac}/A_{clara} diminuem, progressivamente a população do tipo B aumenta, atingindo pico populacional no estágio II. A mesma relação ocorre entre a espermatogônia do tipo B com o espermatócito em preleptóteno (PI) no estágio III, conforme pode ser visto na **figura 11C**.

Adicionalmente, quantificou-se o número de figuras mitóticas e apoptóticas na membrana basal do epitélio seminífero (**Fig. 11D-F**). Mitoses foram identificadas através da morfologia e disposição dos cromossomos nas fases de prófase, metáfase e anáfase (**Fig. 11D**). Por outro lado, figuras apoptóticas caracterizam-se pela descontinuidade do envoltório nuclear, condensação do núcleo e do citoplasma e presença de múltiplos vacúolos em todo conteúdo celular (**Fig. 11E**). Apesar das mitoses serem observadas em todos os estádios do CES, seu número aumentou progressivamente a partir do estágio IV e alcançou pico no estágio III do próximo ciclo ($P < 0,05$; **Fig. 11F**). Dessa forma, coincidindo com os estádios que apresentam as maiores populações de células germinativas e onde ocorre o pico numérico da espermatogônia do tipo B e do espermatócito PI (**Fig. 11C**). Em relação às apoptoses, observou-se morte celular em todos os estádios do CES, entretanto, nenhum comportamento peculiar foi constatado.

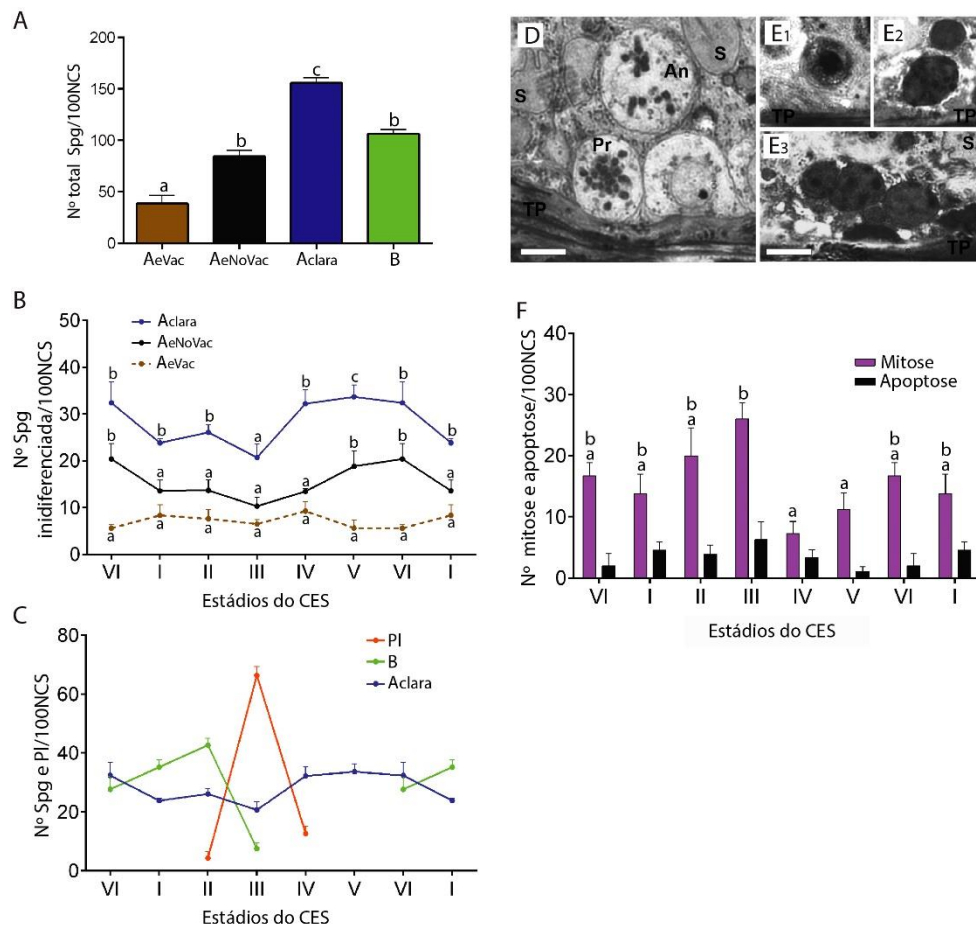


Figura 11. População e cinética espermatogonial. (A) Número total de espermatogônias (Spg) A_{eVac} , A_{eNoVac} , A_{clara} e B no testículo humano, equalizadas por 100 nucléolos de célula de Sertoli (NCS). (a-c, $P < 0,05$). (B) Cinética das espermatogônias A indiferenciadas ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES), equalizadas por 100 NCS. (a-c, $P < 0,05$, dentro dos respectivos estádios do CES). (C) Cinética das espermatogônias A clara e B, e do espermatócito em preleptóteno (PI), equalizadas por 100 NCS. (D) Fotomicrografia sob microscopia de luz de alta resolução de células mitóticas em diferentes fases: (Pr) prófase e (An) anáfase. (E) Fotomicrografias de células apoptóticas (F) Número de figuras mitóticas e apoptóticas ao longo dos estádios do CES, equalizadas por 100 NCS. (a-b, $P < 0,05$). S; célula de Sertoli e TP; túnica própria. Barras: $8\mu m$.

5.3 PROLIFERAÇÃO ESPERMATOGONIAL

Subsequente à determinação da população e cinética espermatogonial, investigou-se a atividade mitótica dos diferentes fenótipos espermatogoniais do homem através da imunomarcagem do antígeno MCM7 (**Figura 12A**). A população de espermatogônias A_{eVac} MCM7+ foi a menor encontrada no testículo, quando comparada com às demais células em atividade mitótica ($P < 0,05$; **Fig. 12B**), apresentando-se como uma espermatogônia relativamente quiescente (de reserva), com taxa de proliferação de apenas 11% (**Fig. 12C**).

Em contrapartida, as A_{eNoVac} apresentaram uma população de células $MCM7+$ um pouco maior do que suas homólogas $MCM7-$ (**Fig. 12B**), obtendo 25% de taxa de proliferação, aproximadamente duas vezes maior que as A_{eVac} (**Fig. 12C**). Por outro lado, as espermatogônias A_{clara} são as indiferenciadas com maior atividade mitótica, com aproximadamente 50% de sua população em proliferação ($P < 0,05$; **Fig. 12B-C**). As espermatogônias diferenciadas do tipo B, como esperado, apresentaram a maior taxa de mitose durante a fase proliferativa da espermatogênese, com 67% de atividade ($P < 0,05$; **Fig. 12B-C**). De forma surpreendente, espermatogônias $A_{eVac} MCM7+$ foram encontradas exclusivamente nos estádios I e II do CES, indicando possível proliferação estágio-dependente (**Fig. 12D**).

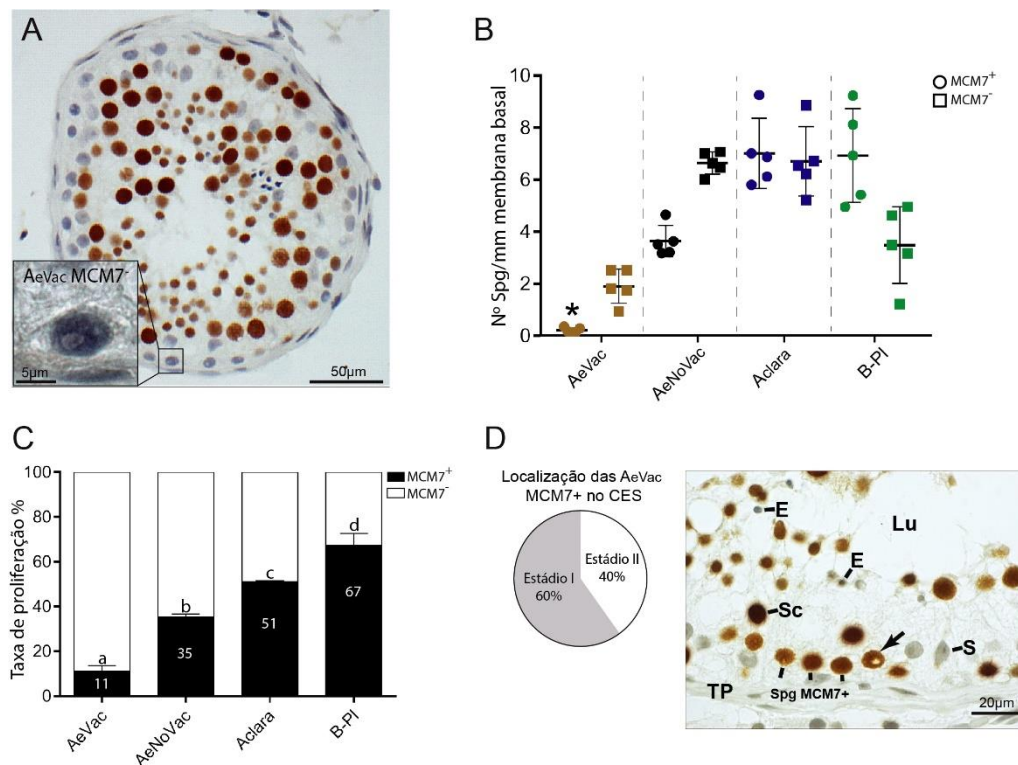


Figura 12. Atividade mitótica espermatogonial. (A) Fotomicrografia de corte transversal de túbulo seminífero após reação imunohistoquímica para o antígeno MCM7, demonstrando a presença de uma $A_{eVac} MCM7-$ (inserto). (B) População dos diferentes fenótipos espermatogoniais em atividade mitótica ($MCM7+$) ou quiescentes ($MCM7-$) por milímetro (mm) de membrana basal. Dados representam valores brutos de cada paciente \pm DPM (*, $P < 0,05$). (C) Taxa de proliferação dos diferentes fenótipos espermatogoniais. (a-d, $P < 0,05$). (D) Localização das espermatogônias $A_{eVac} MCM7+$ no ciclo do epitélio seminífero (CES). Seta, $A_{eVac} MCM7+$; E, espermátides alongadas; Lu, lúmen; S, célula de Sertoli; Sc, espermátócito; Spg, espermatogônia; TP, túnica própria.

5.4 NICHO ESPERMATOGONIAL

Em seguida investigou-se o posicionamento dos diferentes tipos espermatozoniais e espermatozócito em preleptóteno em relação ao vaso sanguíneo mais próximo, ao longo dos estádios do CES (**Fig. 13**). Sob MLAR, a espermatozônia A_{eVac} foi observada mais próxima dos vasos sanguíneos (43-57 μ m) quando comparada com às demais, na maioria dos estádios do CES ($P < 0,05$; **Fig. 13A**). No que concerne as espermatozônias A_{eNoVac} e A_{clara} , ambas posicionam-se na mesma distância da vasculatura ao longo de todo o CES ($P > 0,05$; **Fig. 13A**). Entretanto, ao determinar a distância das espermatozônias quando em atividade mitótica (MCM7+) ou quiescência (MCM7-) em relação aos vasos mais próximos, notou-se que aquelas A_{eVac} que se encontravam adjacentes aos vasos, estavam em estado G0 ($P < 0,05$), enquanto todos os outros tipos espermatozoniais, proliferando ou não, mantiveram-se na mesma distância da vasculatura ($P > 0,05$; **Fig. 13B**), incluindo as A_{eVac} MCM7+.

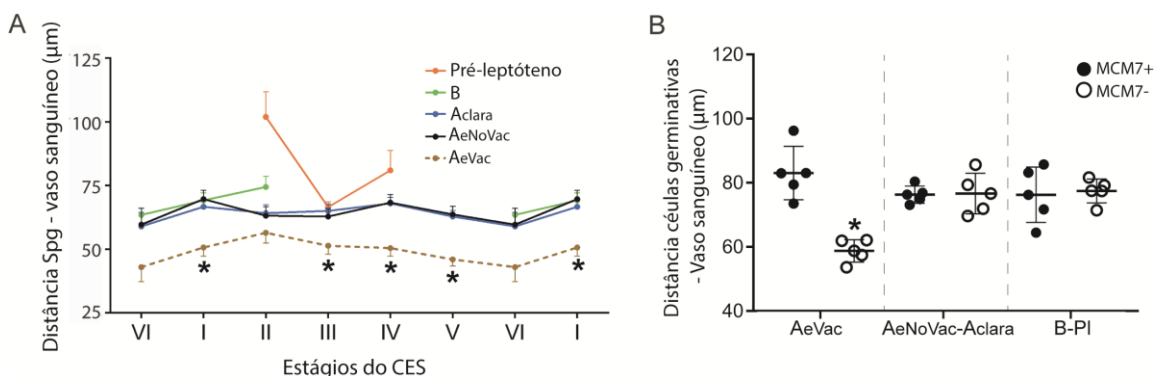


Figura 13. Posicionamento das espermatozônias (Spg) em relação ao vaso sanguíneo mais próximo. (A) Distância dos diferentes fenótipos espermatozoniais e dos espermatozócitos em pré-leptóteno para o vaso sanguíneo mais próximo, ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES). Dados apresentados como média \pm EPM. (*, $P < 0,05$, dentro dos respectivos estádios do CES). (B) Distância entre a espermatozônia A_{eVac} e dos diferentes agrupamentos de células germinativas ativas (MCM7+) ou quiescentes (MCM7-) para o vaso sanguíneo mais próximo (*, $P < 0,05$). Dados representam valores brutos de cada paciente \pm DPM.

5.5 ATIVIDADE ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE UTF1

Após ter identificado a espermatogônia A_{eVac} como provável espermatogônia-tronco de reserva do testículo humano, buscou-se verificar como elas expressavam o conhecido marcador de espermatogônias indiferenciadas UTF1, junto à sua capacidade de proliferação (MCM7), e ainda de forma comparativa com as demais espermatogônias (**Tabela 6**). Neste sentido, utilizou-se inicialmente o marcador de vacúolo EXOSC10 para confirmar que as zonas de rarefação na cromatina presentes nos núcleos (DAPI) eram das A_{eVac} (**Fig. 14A**). Dessa maneira, observou-se que todas as A_{eVac} expressavam UTF1, correspondendo a 16% da população UTF1+ (**Fig. 14B**). Ademais, notou-se que as espermatogônias A_{eVac} possuem atividade mitótica duas vezes menor que as outras células germinativas UTF1+ ($P < 0,05$; **Fig. 14C**) e expressam este marcador, quando quiescentes (MCM7-), em maior taxa do que as A_{eVac} MCM7+ e Outras Spg UTF1+ ($P < 0,05$; **Fig. 14D-E**).

5.6 ATIVIDADE ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE GFRA1

Avaliou-se também a expressão de outro marcador de espermatogônias indiferenciadas, o GFRA1, junto à atividade mitótica (**Tabela 6**). Observou-se que as A_{eVac} representam apenas 11% da população de células GFRA1+ (**Fig. 15A-B**). Entretanto, existe uma pequena subpopulação (12%) de espermatogônias A_{eVac} , quiescentes (MCM7-), que não expressam o GFRA1 (**Fig. 15C-D**). Ademais, além do estado de completa quiescência das A_{eVac} GFRA1-, as A_{eVac} GFRA1+ possuem taxa de proliferação menor do que as Outras Spg GFRA1+, 19% e 41%, respectivamente ($P < 0,05$; **Fig. 15E**).

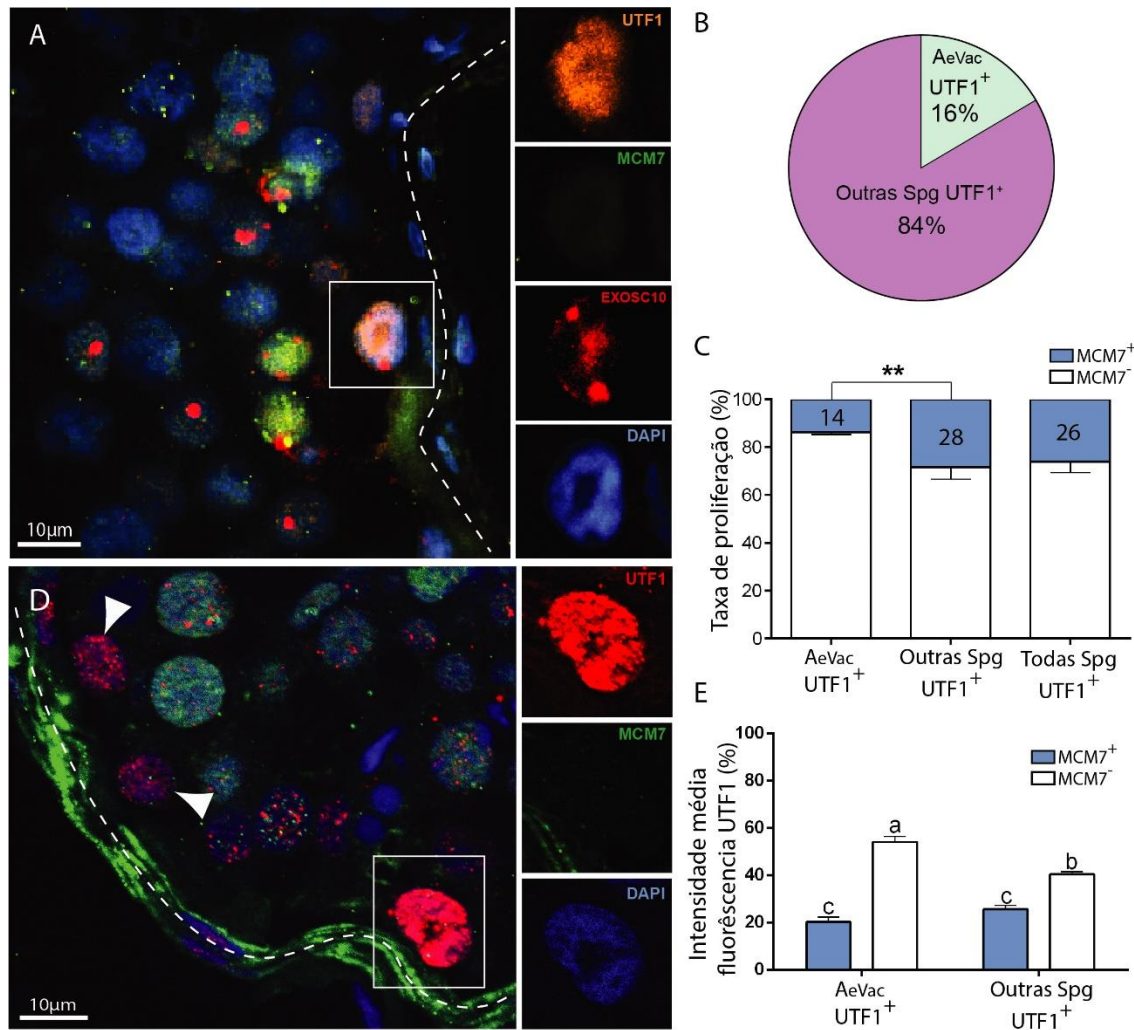


Figura 14. Caracterização da população de espermatogônias UTF1+. (A) Fotomicrografia demonstrando tripla imunolocalização (IF) dos antígenos UTF1, MCM7 e EXOSC10 em uma espermatogônia AeVac (detalhe nos quadrantes à direita). (B) Percentual de AeVac UTF1+ em relação ao total de espermatogônias UTF1+. (C) Taxa de proliferação das espermatogônias UTF1+ (**, $P < 0,005$). (D) Dupla IF dos antígenos UTF1 e MCM7, enfatizando a alta expressão de UTF1 pelas AeVac MCM7- (detalhe nos quadrantes a direita) em relação as outras espermatogônias UTF1+ (não AeVac, cabeças de seta). (E) Porcentagem média da intensidade de UTF1 expressa pelas espermatogônias AeVac e Outras Spg em atividade mitótica (MCM7+) ou quiescentes (MCM7-). (a-c, $P < 0,05$). Spg, espermatogônia; linha tracejada, túnica própria.

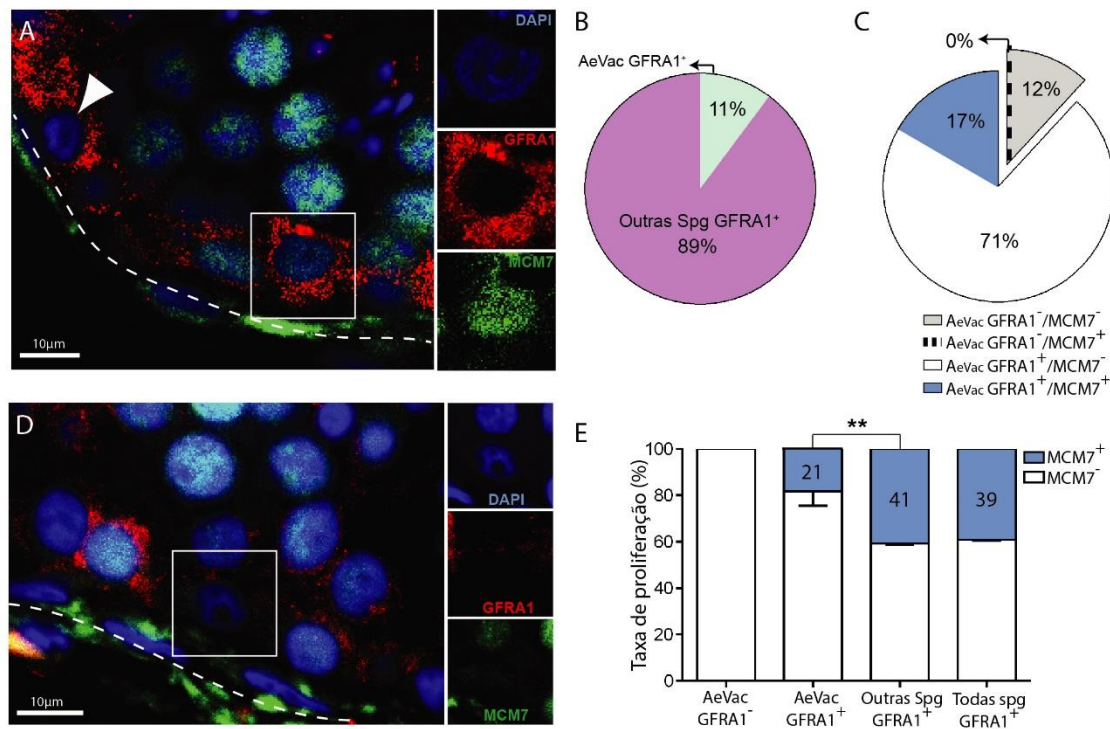


Figura 15. Caracterização da população de espermatogônias GFRA1+. (A) Fotomicrografia de dupla imunolocalização (IF) para os antígenos GFRA1 e MCM7 caracterizando a presença A_{eVac} GFRA1+/MCM7+ (detalhe nos quadrantes à direita) e GFRA1+/MCM7- (cabeça de seta). (B) Porcentagem de A_{eVac} na população de espermatogônias GFRA1+. (C) Porcentagem das subpopulações de A_{eVac} em relação a expressão de GFRA1 e MCM7. (D) Dupla IF para os antígenos GFRA1 e MCM7 demonstrando A_{eVac} GFRA1-/MCM7- (detalhe nos quadrantes à direita). (E) Taxa de proliferação das espermatogônias A_{eVac} e Outras Spg em relação a expressão de GFRA1 (**, $P < 0,005$). Spg, espermatogônia; linha tracejada, túnica própria.

5.7 ATIVIDADE ESPERMATOGONIAL EM RELAÇÃO À COEXPRESSIONO DE UTF1 E GFRA1

Para verificar o perfil indiferenciado das espermatogônias A_{eVac} GFRA1-, em comparação com às demais espermatogônias, realizou-se tripla imunomarcagem dos antígenos UTF1, GFRA1 e MCM7 (**Fig. 16A**). Notou-se que 85% das A_{eVac} são UTF1+/GFRA1+, enquanto uma pequena subpopulação quiescente apresentou-se como UTF1+/GFRA1- (**Tabela 6**), representando 2% do total de células indiferenciadas que expressam ou não UTF1 e GFRA1 (**Fig. 16B**). Observou-se também que, além das A_{eVac} UTF1+/GFRA1-, existem outras espermatogônias UTF1+/GFRA1- (**Fig. 16B**), com baixa atividade mitótica, quando comparado a outras espermatogônias (não A_{eVac}) que expressam o GFRA1 ($P < 0,05$; **Fig. 16C**). Mais adiante, ao investigar a intensidade da expressão de UTF1 pela A_{eVac} UTF1+/GFRA1-/MCM7- com sua homóloga A_{eVac}

UTF1+/GFRA1+/MCM7-, constatou-se que a expressão não é alterada ($P>0,05$; **FIG. 16D**). Entretanto, quando contraposto com as A_{eVac} UTF1+/GFRA1+/MCM7+ e as Outras Spg, a expressão é mais elevada ($P<0,05$; **Fig. 16D**).

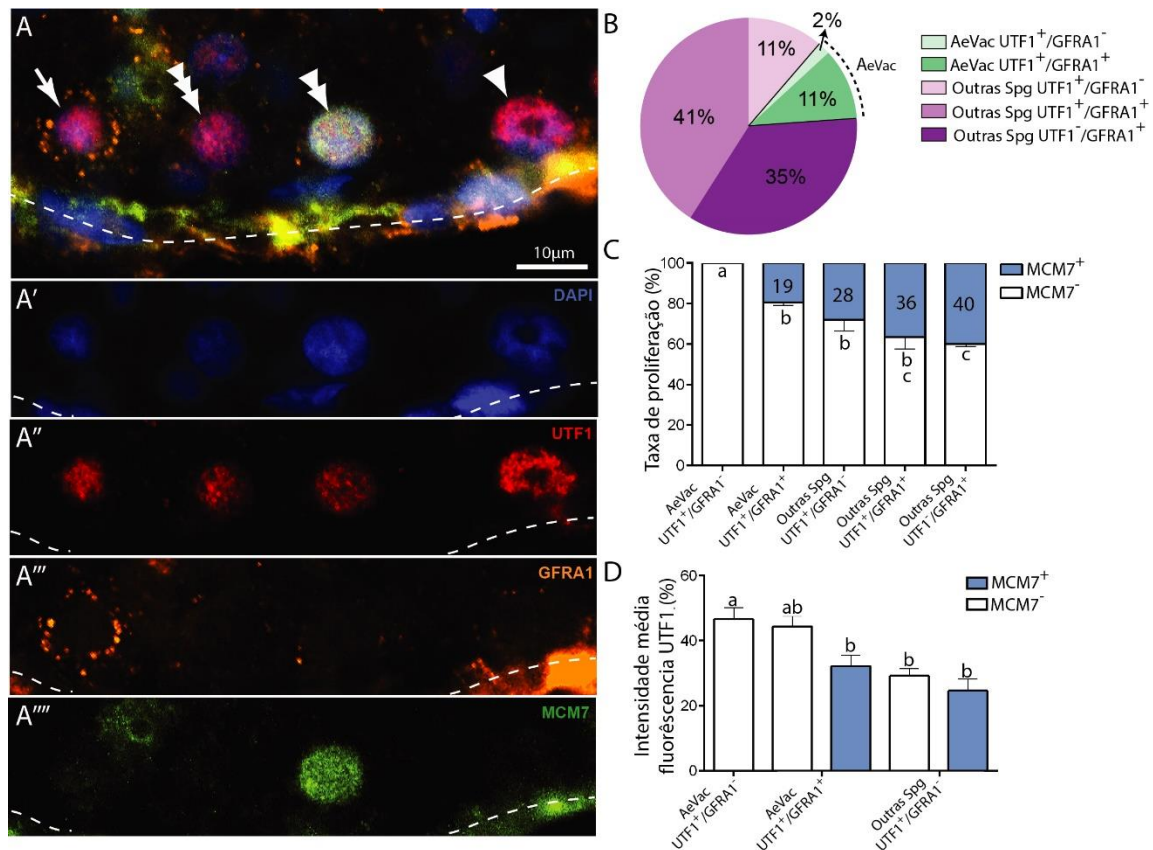


Figura 16. Caracterização da população espermatogonial UTF1/GFRA1. (A) Tripla imunolocalização dos antígenos UTF1 (A''), GFRA1 (A''') e MCM7 (A''''), demonstrando a presença de A_{eVac} UTF1+/GFRA1-/MCM7- (cabeça de seta), Outra Spg UTF1+/GFRA1-/MCM7+ (cabeça de seta dupla), Outras Spg UTF1+/GFRA1-/MCM7- (cabeça de seta tripla), e Outras Spg UTF1+/GFRA1+/MCM7- (seta). (B) Porcentagem das subpopulações de A_{eVac} dentro da população de espermatogônias UTF1 e GFRA1. (C) Taxa de proliferação das A_{eVac} e Outras Spg UTF1 e GFRA1 (a-c, $P<0,05$). (D) Porcentagem média da intensidade de UTF1 expressa pelas espermatogônias A_{eVac} e Outras Spg em atividade mitótica (MCM7+) ou quiescentes (MCM7-). (a-c, $P<0,05$). Spg, espermatogônia; linha tracejada, túnica própria.

5.8 ATIVIDADE DAS ESPERMATOGÔNIAS UTF1 E GFRA1 EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE C-KIT

Objetivando identificar a expressão do marcador de espermatogônias diferenciadas c-KIT pelas espermatogônias indiferenciadas A_{eVac} e Outras Spg bem como seu potencial de proliferação, tripla-imunolocalização dos respectivos anticorpos GFRA1, UTF1 e MCM7 foi realizada (**Tabela 5 e Fig. 17A-B**). Não se encontrou A_{eVac} expressando c-KIT (**Tabela 6**), enquanto 11% das Outras Spg GFRA1+ (**Fig. 17C**) e UTF1+ (**Fig. 17D**) o expressam. Ademais, confirmou-se a alta taxa de proliferação das espermatogônias diferenciadas c-KIT+, conforme observado na **Figura 17E**.

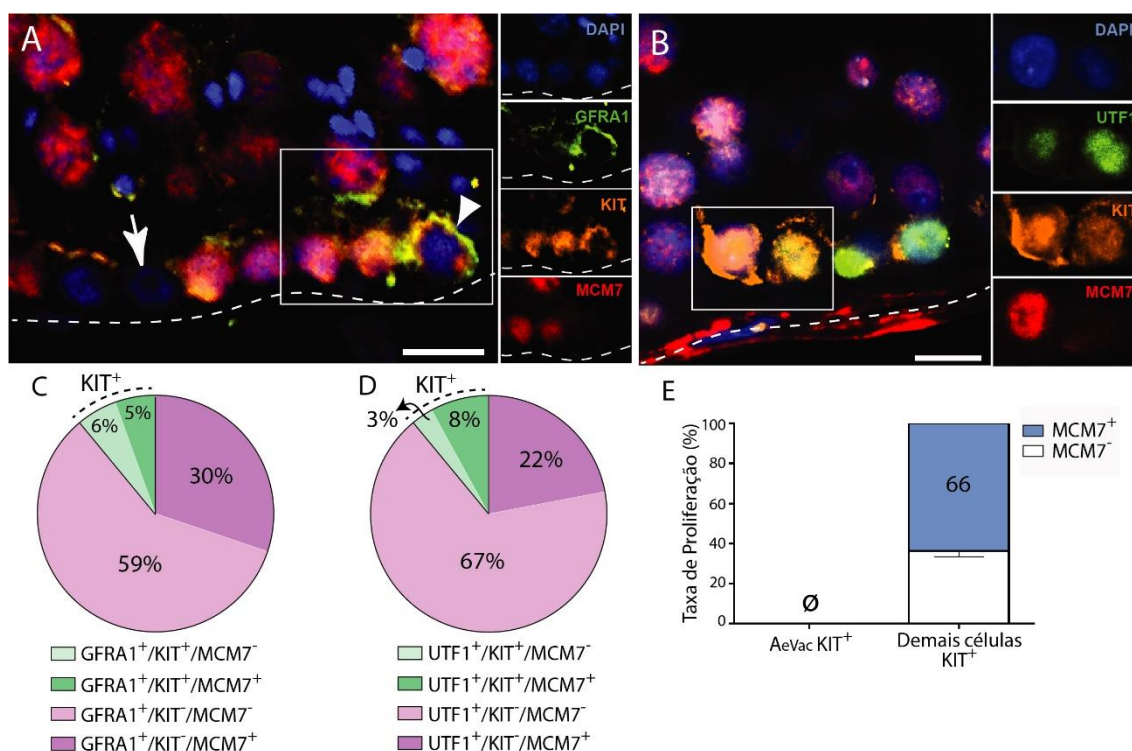


Figura 17. Caracterização da expressão de c-KIT pela população das espermatogônias UTF1+ e GFRA1+. (A) Tripla imunolocalização (IF) dos antígenos GFRA1, c-KIT, e MCM7, demonstrando A_{eVac} KIT- (cabeça de seta, detalhes no quadrantes à direita). (B) Tripla IF dos antígenos UTF1, KIT e MCM7, demonstrando Outras Spg UTF1+/KIT+. (C) Porcentagem das subpopulações de espermatogônias GFRA1+ mitoticamente ativas (MCM7+) ou quiescentes (MCM7-) que expressam KIT. (D) Porcentagem das subpopulações de espermatogônias UTF1+ mitoticamente ativas (MCM7+) ou quiescentes (MCM7-) que expressam KIT. (E) Taxa de proliferação das espermatogônias KIT+; linha tracejada, túnica própria.

Tabela 6. População da espermatogônia A_{evac} e das Outras Spg/PI (espermatogônia/preleptóteno), em relação à expressão, exclusiva ou em conjunto, de UTF1, GFRA1 e KIT, associado à proliferação celular (MCM7), por milímetro de membrana basal de túbulos seminíferos (n^0/mm).

CG	UTF1 (n=5)		GFRA1 (n=5)		UTF1/GFRA1 (n=3)		GFRA1/KIT (n=3)		UTF1/KIT (n=3)	
	Perfil proteico	n^0/mm^*	Perfil proteico	n^0/mm	Perfil proteico	n^0/mm	Perfil proteico	n^0/mm	Perfil proteico	n^0/mm
AeVac	UTF1-	NOB	GFRA1-/MCM7-	0.35 ± 0.10	UTF1-	NOB	GFRA1-/KIT-/MCM7-	0.54 ± 0.09	UTF1-	NOB
	UTF1+/MCM7-	2.80 ± 0.40	GFRA1-/MCM7+	NOB	UTF1+/GFRA1-/MCM7-	0.68 ± 0.04	GFRA1-/KIT-/MCM7+	NOB	UTF1+/KIT-/MCM7-	2.95 ± 0.25
	UTF1+/MCM7+	0.46 ± 0.12	GFRA1+/MCM7-	2.11 ± 0.42	UTF1+/GFRA1-/MCM7+	NOB	GFRA1+/KIT-/MCM7-	2.99 ± 0.10	UTF1+/KIT-/MCM7+	0.44 ± 0.09
			GFRA1+/MCM7+	0.50 ± 0.11	UTF1+/GFRA1+/MCM7-	3.22 ± 0.08	GFRA1+/KIT-/MCM7+	0.55 ± 0.13	KIT+	NOB
				UTF1+/GFRA1+/MCM7+	0.78 ± 0.09	KIT+	NOB			
Outras Spg/PI	UTF1+/MCM7-	12.04 ± 1.40	GFRA1+/MCM7-	13.44 ± 2.77	UTF1+/GFRA1-/MCM7-	3.10 ± 0.70	GFRA1+/KIT-/MCM7-	15.55 ± 0.48	UTF1+/KIT-/MCM7-	13.77 ± 0.76
	UTF1+/MCM7+	4.62 ± 0.48	GFRA1+/MCM7+	9.48 ± 2.16	UTF1+/GFRA1-/MCM7+	1.11 ± 0.09	GFRA1+/KIT-/MCM7+	8.98 ± 0.36	UTF1+/KIT-/MCM7+	4.99 ± 0.82
					UTF1+/GFRA1+/MCM7-	10.50 ± 1.41	GFRA1+/KIT+/MCM7-	1.76 ± 1.00	UTF1+/KIT+/MCM7-	0.87 ± 0.01
					UTF1+/GFRA1+/MCM7+	4.71 ± 0.82	GFRA1+/KIT+/MCM7+	1.74 ± 0.98	UTF1+/KIT+/MCM7+	2.07 ± 0.03
					UTF1-/GFRA1+/MCM7-	7.64 ± 0.74	GFRA1-/KIT+/MCM7-	4.94 ± 1.18	UTF1-/KIT+/MCM7-	4.34 ± 0.33
					UTF1-/GFRA1+/MCM7+	4.42 ± 0.45	GFRA1-/KIT+/MCM7+	9.17 ± 0.96	UTF1-/KIT+/MCM7+	11.80 ± 0.61
Total	UTF1+	19.93 ± 3.37	GFRA1+	25.52 ± 4.41	UTF1+/GFRA1-	4.89 ± 0.65	GFRA1+/KIT-	28.07 ± 0.80	UTF1+/KIT-	22.14 ± 0.06
					UTF1+/GFRA1+	19.21 ± 1.60	GFRA1+/KIT+	3.50 ± 1.08	UTF1+/KIT+	2.94 ± 0.02
					UTF1-/GFRA1+	12.06 ± 0.97	GFRA1-/KIT+	14.12 ± 2.09	UTF1-/KIT+	16.14 ± 0.94

CG, célula germinativa; Spg, espermatogônia; PI, espermatócito em preleptóteno; NOB, não observado; (n) número de doadores utilizados; *média \pm EPM

5.9 IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO ESPERMATOGONIAL TSPAN33

O receptor de membrana TSPAN33 foi selecionado como marcador de espermatogônias indiferenciadas primitivas (Guo et al., 2018; Shami et al. 2020) e sua expressão foi avaliada nos diferentes fenótipos espermatogoniais do homem (**Fig. 18**). A princípio, observou-se que TSPAN33 é expresso pela quase totalidade das A_{eVac} , o que foi confirmado via IHC e dupla marcação de TSPAN33 com UTF1 (**Fig. 18A-C**). Por outro lado, observou-se uma redução progressiva de sua expressão na medida em que os fenótipos mudam de A_{eNoVac} para A_{clara} (**Fig. B-C**). Além disso, notou-se que TSPAN33 não é exclusivamente um marcador de espermatogônias indiferenciadas, pois algumas espermatogônias do tipo B e raros espermatócitos também o expressam (**Fig. 18C-D**).

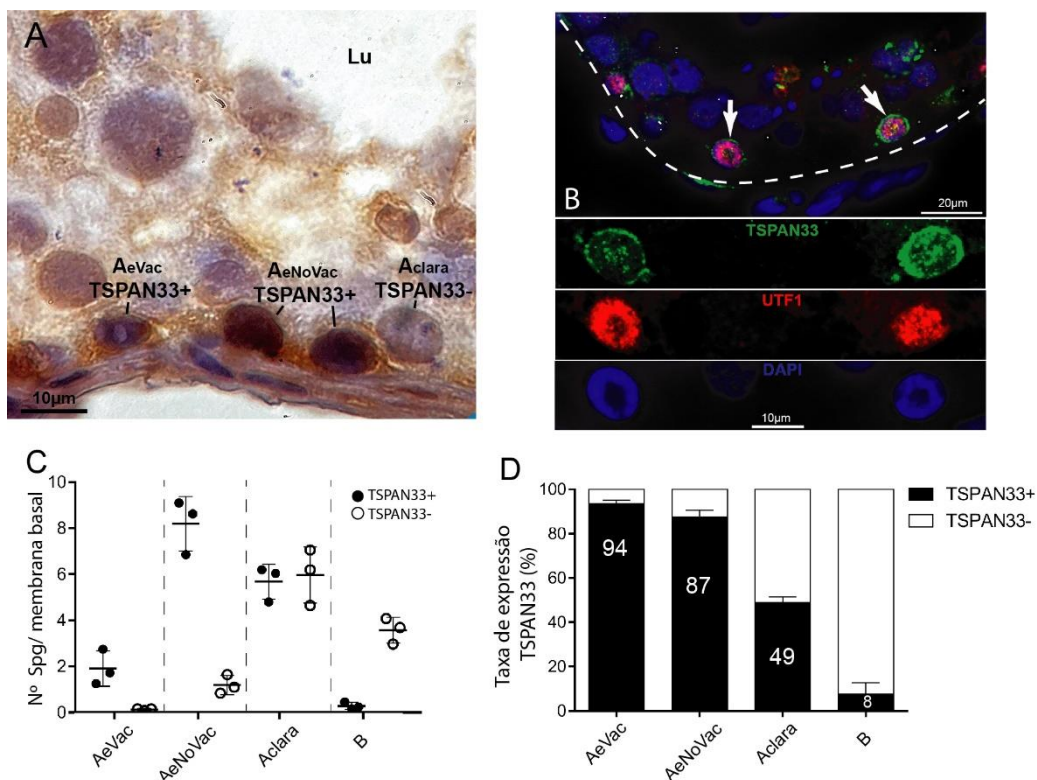


Figura 18. Identificação dos fenótipos espermatogoniais TSPAN33. (A) Imunohistoquímica para localização do antígeno TSPAN33 nos diferentes fenótipos espermatogoniais. (B) Dupla imunolocalização de TSPAN33 e UTF1 demonstrando a expressão de TSPAN33 pelas espermatogônias A_{eVac} (setas, detalhes nos quadrantes abaixo). (C) População de espermatogônias TSPAN33+ e TSPAN33- nos respectivos fenótipos: A_{eVac} , A_{eNoVac} , A_{clara} e B, por milímetro (mm) de membrana basal. Dados representam valores brutos de cada paciente \pm DPM. (D) Taxa da expressão de TSPAN33 pelos diferentes fenótipos espermatogoniais. Seta, A_{eVac} ; Lu, lúmen; Spg, espermatogônia; linha tracejada, túnica própria.

5.10 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPERMATOGONIAS TSPAN33 EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DE MCM7, UTF1, GFRA1 E KIT

Após identificação da população de espermatogônias TSPAN33, realizou-se IF para investigar a atividade mitótica das espermatogônias TSPAN33+ (**Fig. 19A**). Observou-se que sua população apresenta poucas células expressando MCM7(**Fig. 19B**), dessa forma, exibindo uma baixa taxa de proliferação (**Fig. 19C**), de apenas 21%.

Quanto a expressão do marcador de espermatogônias indiferenciadas UTF1 (**Fig. 19D**), as células TSPAN33+ a expressam em grande quantidade (**Fig. 19E**). Desse modo, nota-se uma grande subpopulação de espermatogônias indiferenciadas que coexpressam UTF1 e TSPAN33 (**Fig. 19E-F**), o que representa 77% da população TSPAN33+ (**Fig. 19F**).

Em relação ao marcador GFRA1 (**Fig. 19G**), existem mais espermatogônias TSPAN33+/GFRA1+ do que TSPAN33+/GFRA1- (**Fig. 19H**). Por outro lado, a população TSPAN33-/GFRA1+ é bem elevada (**Fig. 19H-I**), observando-se uma coexpressão com TSPAN33 de 69%.

Investigando a expressão do marcador de espermatogônias diferenciadas c-KIT (**Fig. 19J**), notou-se que poucas espermatogônias TSPAN33 o expressam (**Fig. 19K**), o que representa apenas 14% de sua população (**Fig. 19L**), indicando seu status indiferenciado.

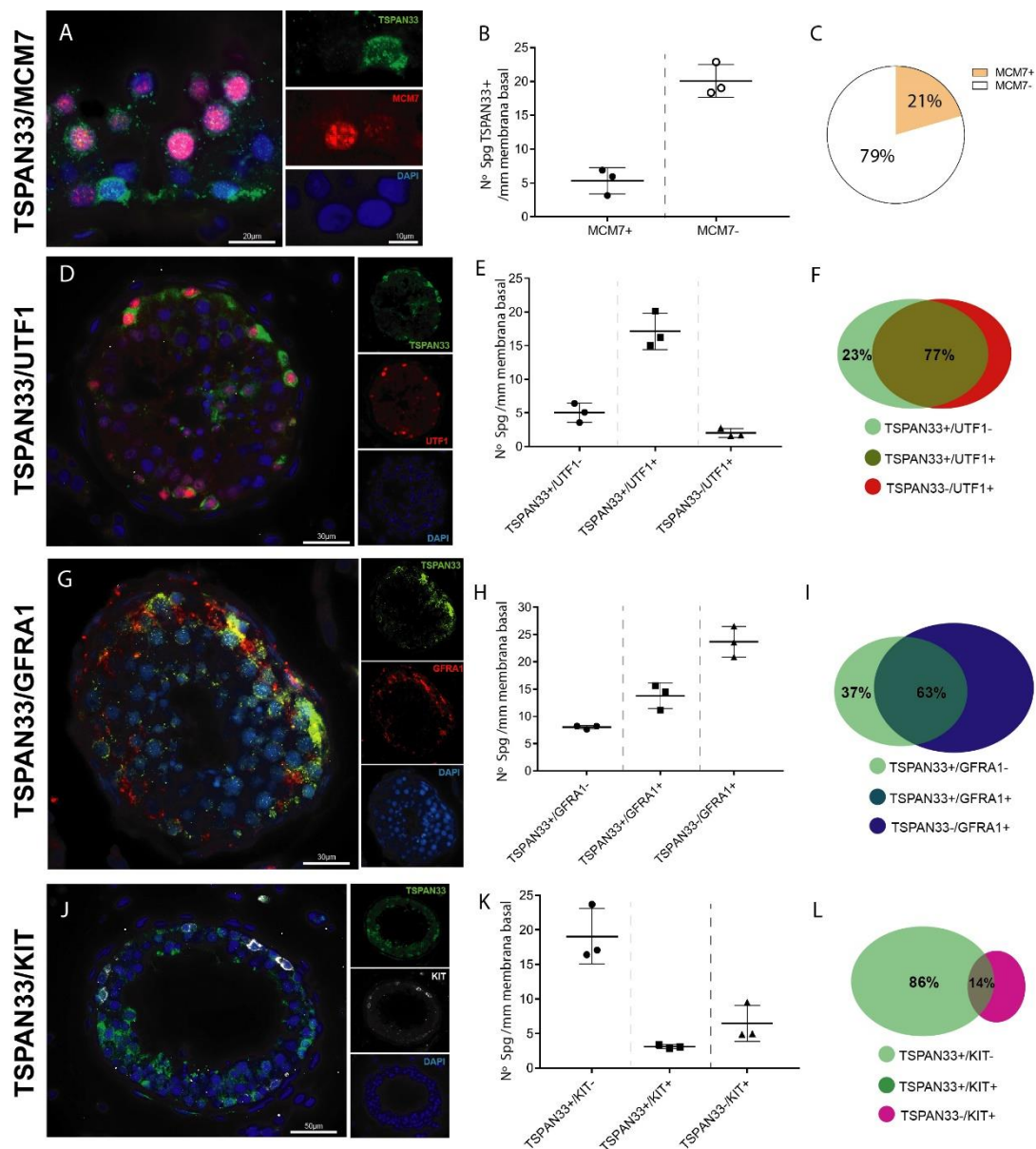


Figura 19. Caracterização das espermatogônias TSPAN33+ em relação a atividade mitótica e expressão de marcadores espermatogoniais. (A) Dupla imunolocalização (IF) dos antígenos TSPAN33 e MCM7. (B) População de espermatogônias (Spg) TSPAN33+ mitoticamente ativas (MCM7+) e quiescentes (MCM7-) por milímetro (mm) de membrana basal (Dados representam valores brutos de cada paciente \pm DPM). (C) Taxa de proliferação das Spg TSPAN33+. (D) Dupla IF dos antígenos TSPAN33 e UTF1. (E) População espermatogonial em relação a expressão de TSPAN33 e UTF1, por mm de membrana basal (Dados representam valores brutos de cada paciente \pm DPM). (F) Representação do tamanho das populações de Spg TSPAN33 e UTF1, indicando as respectivas proporções de sobreposição ou não (%). (G) Dupla IF dos antígenos TSPAN33 e GFRA1. (H) População espermatogonial em relação a expressão de TSPAN33 e GFRA1, por mm de membrana basal (Dados representam valores brutos de cada paciente \pm DPM). (I) Representação do tamanho das populações de Spg TSPAN33 e GFRA1, indicando as respectivas proporções de sobreposição ou não (%). (J) Dupla IF dos antígenos TSPAN33 e c-KIT. (K) População espermatogonial em relação a expressão de TSPAN33 e c-KIT, por mm de membrana basal (Dados representam valores brutos de cada paciente \pm DPM). (L) Representação do tamanho das populações de Spg TSPAN33 e c-KIT, indicando as respectivas proporções de sobreposição ou não (%).

5.11 CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS TSPAN33

Posterior a caracterização das espermatogônias TSPAN33+ *in vivo*, investigou-se o potencial de transplante e colonização das mesmas, após xenotransplante para camundongos inférteis, em relação a expressão, em conjunto ou não, com um conhecido marcador que isola SSCs humanas de elevado potencial de espermatogônia-tronco, o SSEA4.

Como pode ser observado na **Figura 20A**, a quantificação das espermatogônias TSPAN33+ (TSPAN33+/SSEA4- e TSPAN33+/SSEA4+), no testículo dos camundongos, demonstrou baixo número de células (**Fig. 20A-B**), não havendo diferença entre suas populações e aquela proveniente do grupo controle ($P>0,05$). Por outro lado, quando contraposto o número de espermatogônias humanas TSPAN33-/SSEA4+ com os demais grupos, observa-se elevada população celular ($P<0,05$; **Fig. 20A, C**). As espermatogônias que não expressam ambos marcadores (TSPAN33-/SSEA4-) também obtiveram baixa capacidade de colonização (**Fig.20A**).

Ao avaliar a forma como as espermatogônias se apresentavam em cada um dos grupos avaliados (**Fig. 20D**), notou-se que as espermatogônias TSPAN33+, além de apresentarem menor população, foram vistas somente como células isoladas ou pareadas (**Fig. 20E**). Em contrapartida, mesmo apresentando baixo número de células, as espermatogônias do grupo controle e TSPAN33-/SSEA4- foram observadas nas três formas: isoladas, pareadas e alinhadas (**Fig. 20D**). Ademais, as espermatogônias TSPAN33-/SSEA4+ apresentaram-se como células nas três formas organizacionais, com elevado número de células em alinhamento (**Fig. 20D, F**).

Neste sentido, avaliou-se o tamanho do sincício que cada uma das colônias espermatogoniais se encontrava, em cada um dos grupos (**Fig. 20G**), o que confirmou as espermatogônias TSPAN33-/SSEA4+ como aquelas que apresentam maiores cadeias celulares, atingindo até 16 espermatogônias conectadas via pontes intracitoplasmáticas.

Além disso, notou-se nos grupos TSPAN33+ (SSEA4+/SSEA4-) a existência de formações celulares atípicas na forma de nódulos e com células vacuolizadas, conforme observado na **Figura 20H**. Essas células não foram contabilizadas como espermatogônias.

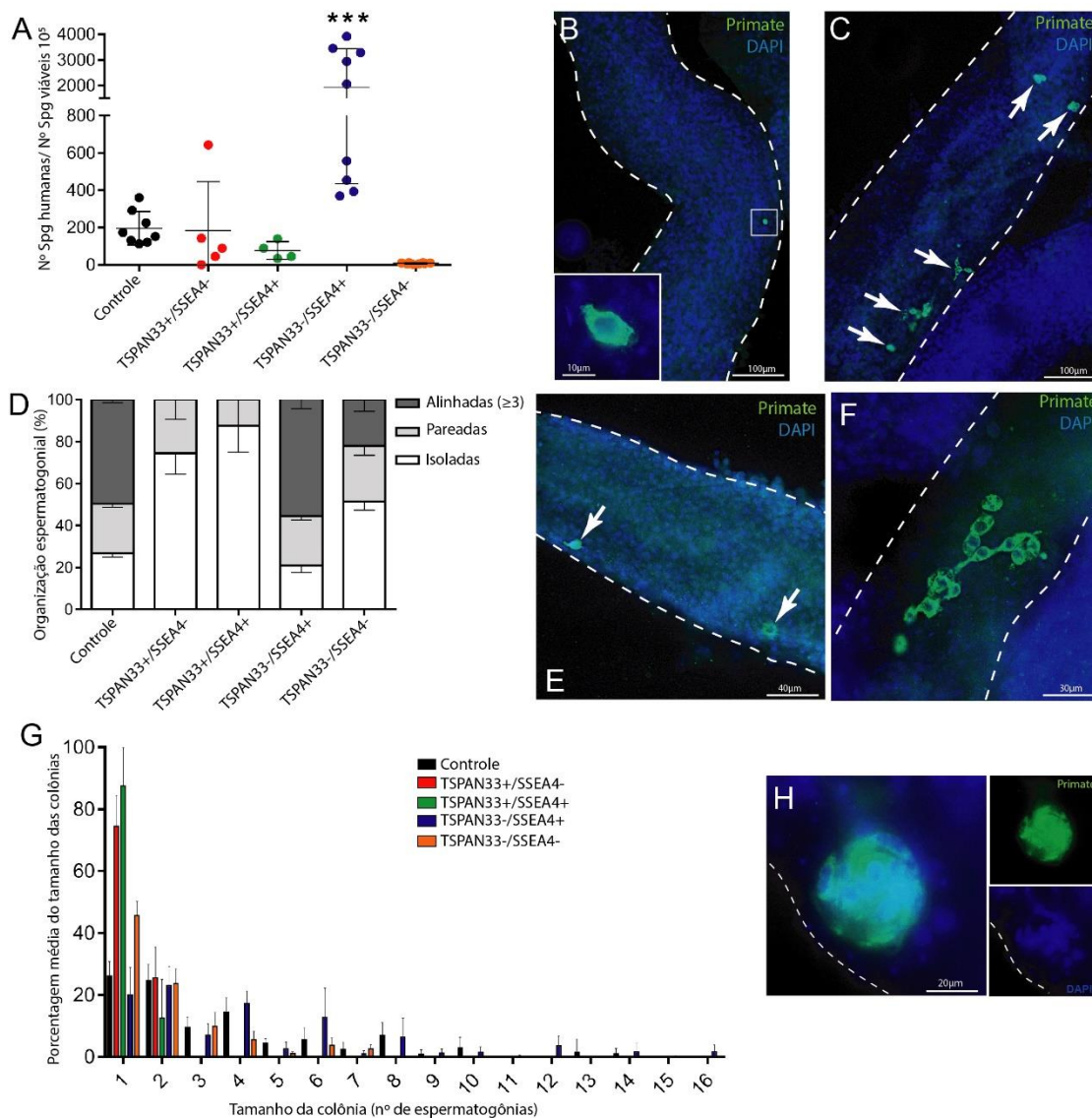


Figura 20. Potencial de colonização das espermatogônias humanas TSPAN33 e SSEA4 após xenotransplante em camundongos imunodeficientes. (A) Número de espermatogônias humanas no testículo dos receptores, provenientes dos cinco grupos, equalizadas pelo número de espermatogônias viáveis transplantadas. Cada círculo representa dado de um grupo apresentado como média \pm DPM (***, $P < 0,0001$). (B) Imunolocalização (IF) uma espermatogônia TSPAN33+/SSEA4- e (C) de espermatogônias TSPAN33-/SSEA4+ (setas). (D) Porcentagem média da forma como as espermatogônias provenientes dos cinco diferentes grupos foram observadas em: isoladas, pareadas ou alinhadas (três ou mais células). (E) IF de espermatogônias isoladas TSPAN33+/SSEA4- (setas) e (F) cadeia de espermatogônias alinhadas TSPAN33-/SSEA4+. (G) Porcentagem média do tamanho das colônias, nos cinco grupos. (H) Espermatogônias TSPAN33+ com morfologia atípica após xenotransplante. Spg, espermatogônia; linhas tracejadas, túnica própria.

6 DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, estudos demonstraram que as espermatogônias propostas como sendo as células-tronco espermatogoniais (SSC) da espermatogênese humana, morfologicamente conhecidas como A_{escura} (com e sem vacúolo nuclear) e A_{clara} , apresentam natureza bastante heterogênea. Essa complexidade em relação à expressão de genes específicos, atividade mitótica, metabolismo celular, capacidade de colonização e principalmente a correlação destes fatores com a morfologia nuclear, impossibilitam não só a identificação de uma população/fenótipo com atividade-tronco específica, mas também o entendimento da dinâmica espermatogonial (Clermont, 1966; von Kopylow et al., 2012a,b; Di Persio et al., 2017; Guo et al., 2018; Wang et al., 2018; Sohni et al., 2019; Shami et al., 2020). No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez que as espermatogônias A_{eVac} correspondem a menor população espermatogonial (10%), apresentando pouca variação ao longo dos estádios do CES; possuem baixa atividade mitótica (~10% em proliferação) e posicionam-se mais próximas de vasos sanguíneos quando quiescentes; expressam de forma peculiar marcadores específicos de SSCs primitivas como o UTF1 (em grande intensidade), TSPAN33 (95%) e a ausência de GFRA1 em 12% de sua subpopulação. Ademais, evidenciou-se que a subpopulação de espermatogônias indiferenciadas TSPAN33, que apresenta reduzida atividade mitótica (20%), possui baixa capacidade de colonização e proliferação após xenotransplante para camundongos inférteis. Estes achados caracterizam a A_{eVac} como sendo as espermatogônias indiferenciadas mais primitivas (de reserva) do testículo humano, além de demonstrar que as espermatogônias altamente indiferenciadas TSPAN33+ apresentam baixa capacidade de colonização pós-xenotransplante.

Inicialmente, buscando demonstrar a dinâmica populacional (cinética) das espermatogônias humanas dentro do ciclo do epitélio seminífero (CES), utilizou-se de microscopia de luz de alta resolução e da divisão do CES em VI estádios, conforme descrito previamente por Clermont, 1963 e revisto por Nihi et al., 2017. Entretanto, baseando-se nos recentes achados do primata *Callithrix penicillata*

(Caldeira-Brant et al., 2018), separou-se as espermatogônias em quatro fenótipos distintos: A_{eVac} , A_{eNoVac} , A_{clara} e B. Neste contexto, demonstramos que a população de A_{eVac} é menor do que as demais espermatogônias indiferenciadas (A_{und} : A_{eNoVac} e A_{clara}) e apresenta pequena variação numérica ao longo dos VI estádios do CES. De forma oposta, as populações de espermatogônias A_{eNoVac} e A_{clara} modificam-se de forma significativa, apresentando números consideravelmente maiores do que as A_{eVacs} nos estádios tardios do CES (IV-VI). Estes achados sugerem a A_{eVac} como sendo uma espermatogônia de reserva, estando de acordo com dados prévios da literatura que caracterizam SSCs de reserva como sendo células de pequena população e com pouca variabilidade numérica dentro do CES, sob condições fisiológicas normais (Lock et al, 1982; Van Beek et al., 1984).

No que concerne a cinética das espermatogônias A_{eNoVac} e A_{clara} , observou-se que, embora suas populações difiram-se na maioria dos estádios do CES, elas seguem o mesmo padrão de variação. Ocorre um aumento de seus números exatamente nos estádios pós-espermição (III-IV), onde o *pool* de espermatogônias do tipo B está diminuindo devido a formação dos espermatócitos em PI (aumento no número de figuras mitóticas). Este comportamento sugere que a A_{eNoVac} e A_{clara} dividem-se ativamente durante este período para suprir a população de espermatogônias do tipo B na próxima onda do CES, assim como observado para as espermatogônias indiferenciadas $A_{alinhada}$, nos roedores, que aumentam sua taxa de proliferação nesta fase, recompondo a população das espermatogônias diferenciadas A_1 (Lok et al., 1982; revisão em de Rooij, 1998). Ainda que os achados aqui apresentados sugiram a A_{eNoVac} e A_{clara} como as células em atividade proliferativa dentro do CES, o presente estudo não determina o papel de cada um destes fenótipos dentro da dinâmica espermatogonial.

Em relação a atividade mitótica espermatogonial, estudos prévios utilizando-se da imunolocalização do antígeno nuclear KI67 caracterizaram a espermatogônia A_{escura} (Di Persio et al., 2017) e sua variação morfológica A_{eVac} (von Kopylow et al., 2012a) como células quiescentes (KI67-). Entretanto, a probabilidade de se identificar uma célula com baixa taxa de proliferação (em

fase G0) imunomarcada com KI67 é pequena, pois este antígeno encontra-se em abundância somente durante as fases G2 e M do ciclo celular, que duram poucas horas (Bruno e Darzynkiewicz, 1992). Neste contexto, visando aumentar as chances de localizar uma SSC de reserva proliferando no CES, utilizamos o marcador de proliferação celular de amplo espectro MCM7. Esta proteína faz parte do complexo de iniciação de replicação (MCMs) do DNA, presente principalmente durante as fases mais longas do ciclo celular: G1 e S (Blow e Hodgson, 2002; Com et al., 2006). Dessa maneira, identificamos que apenas 11% das A_{eVac} estão em proliferação, o que corresponde a 0,5% das células presentes na membrana basal do epitélio seminífero do homem. Este achado está de acordo com trabalho de Pohl et al. (2019), que demonstrou as A_{eVac} como células relativamente quiescentes, utilizando-se do marcador de proliferação celular PCNA. Curiosamente, as A_{eVac} MCM7+ foram exclusivamente localizadas nos estádios I e II do CES, período em que as populações de A_{eNoVac} e A_{clara} estão em gradativa redução. Este achado sugere que as A_{eVac} podem estar se dividindo para repor o estoque de A_{eNoVac} e/ou A_{clara} , em virtude de que suas populações (A_{eNoVac} e A_{clara}) elevam-se progressivamente a posteriori. Por outro lado, e conforme esperado devido a sua flutuação populacional ao longo do CES, a A_{eNoVac} demonstrou atividade mitótica significativamente maior (3x) que a A_{eVac} . A distinção entre a taxa de proliferação das duas variantes morfológicas da espermatogônia A_{escura} foi demonstrada pela primeira vez no presente trabalho e confirma que as espermatogônias de reserva do testículo humano são as A_{eVac} , e não toda população de A_{escura} , conforme descrito previamente (Clermont et al., 1966; Clermont e Antar 1973; Ehmcke et al., 2005). Em relação a A_{clara} , observou-se que são espermatogônias indiferenciadas com 50% de sua população em proliferação, estando de acordo com estudos prévios que as classificaram como células-tronco progenitoras (Clermont et al., 1966; Clermont e Antar 1973; Ehmcke et al., 2005). Apesar de demonstrar que as espermatogônias indiferenciadas do homem possuem cinética e atividade mitótica divergentes, o presente trabalho não esclarece a dinâmica espermatogonial em termos de autorenovação e diferenciação entre os diferentes fenótipos investigados.

Posteriormente, demonstrou-se de forma inédita, em humanos, que as A_{eVac} quiescentes (MCM7-) posicionam-se mais próximas dos vasos sanguíneos do que as demais espermatogônias. A localização preferencial de SSCs em regiões adjacentes ao interstício, local rico em vasos sanguíneos, já havia sido demonstrado anteriormente em várias espécies de mamíferos (Chiarini-Garcia et al., 2003, 2009; Yoshida et al., 2007; do Nascimento et al., 2009; Costa et al., 2012), incluindo em primata não-humano (Caldeira-Brant et al., 2018). Este posicionamento específico fornece evidências da presença de nicho espermatogonial no testículo humano, em que prováveis fatores provenientes dos vasos sanguíneos, ou de regiões adjacentes, controlem a atividade mitótica da A_{eVac} . Em roedores, Kitadate et al. (2018) demonstraram que espermatogônias indiferenciadas posicionadas próximas aos vasos requerem fatores tais como os FGFs, provenientes das células endoteliais, para manter sua capacidade de autorenovação. Interessantemente, von Kopylow e colaboradores (2012b) demonstraram a presença de um dos receptores de FGFs, o FGFR3, na população de A_{eVac} . Dessa forma, estudos morfofuncionais futuros são necessários para investigar a relação entre A_{eVac} , proliferação celular, expressão de FGFR3 e vasos sanguíneos.

Considerando que os resultados morfométricos até aqui apresentados sugeriram a A_{eVac} como espermatogônia indiferenciada de reserva, prosseguiu-se para a investigação da expressão de marcadores espermatogoniais específicos, junto à atividade mitótica, buscando confirmar seu estado altamente indiferenciado (SSC). Através de imunomarcação para o antígeno UTF1, notou-se que 100% das A_{eVac} o expressavam, conforme previamente descrito (von Kopylow et al., 2012a,b), e que, de forma inédita, elas possuem taxa de proliferação menor que as demais espermatogônias UTF1+. De forma similar, as A_{eVac} também possuem a menor atividade mitótica entre a população que expressa GFRA1. Não obstante, foi observado que 12% das A_{eVac} não expressavam GFRA1, em contraste com dados anteriores da literatura que demonstraram a expressão deste receptor em todas $A_{escuras}$ (von Kopylow et al., 2012a; Jan et al., 2017). Surpreendentemente, identificou-se que toda esta subpopulação de A_{eVac} UTF1+/GFRA1- encontrava-se quiescente (MCM7-) e que elas representavam

apenas 2% da população total de espermatogônias UTF1/GFRA1. Estudo prévio de Di Persio e colaboradores (2017) demonstrou, sem diferenciar as espermatogônias por fenótipos, que existe, de fato, uma subpopulação de espermatogônias UTF1+/GFRA1- quiescentes (utilizando-se do KI67, nesta ocasião). Entretanto, no presente trabalho, separando a A_{eVac} das demais espermatogônias indiferenciadas e utilizando-se do MCM7, foi possível diferenciar duas subpopulações de A_{eVac} : (1) A_{eVac} exclusivamente quiescente (UTF1+/GFRA1-/MCM7-) e (2) outras espermatogônias UTF1+/GFRA1-mitoticamente ativas (28% em proliferação), demonstrando, mais uma vez, o estado funcional de reserva deste fenótipo espermatogonial. Embora o GFRA1 seja historicamente considerado um marcador conservado entre SSCs, o presente trabalho, em concordância com estudos moleculares recentes (Guo et al., 2018; Hermann et al., 2018; Sohni et al., 2019), evidenciou que as espermatogônias GFRA1+ possuem atividade mitótica elevada em comparação com às demais A_{und} , inclusive quando se comparam subpopulações de A_{eVac} UTF1+/GFRA1(+/-). Neste sentido, o presente estudo confirma que subpopulações primitivas de SSCs não expressam GFRA1. Subsequentemente, levando em consideração que o UTF1 é altamente expresso em espermatogônias muito indiferenciadas (primitivas) (Guo et al., 2018; Sohni et al., 2019), quantificou-se a intensidade de fluorescência do UTF1 e observou-se, de forma inédita, que as A_{eVac} quiescentes o apresentam em maior quantidade que as demais A_{und} do testículo humano. Neste contexto, para confirmar o estado de SSC primitivo das A_{eVac} , realizou-se imunomarcação para o antígeno de espermatogônias diferenciadas c-KIT, não sendo observado nenhuma A_{eVac} c-KIT+, concordando com dados prévios de von Kopylow et al. (2012a). Dessa forma, o presente estudo demonstra, de forma inédita, que as A_{eVac} UTF1+/GFRA1-/KIT-/MCM7- representam a subpopulação de espermatogônias primitivas de reserva do testículo humano.

Após classificação das A_{eVac} como espermatogônia indiferenciada de reserva, buscou-se analisar o potencial de célula-tronco espermatogonial (SSC) que essa subpopulação primitiva possui, através de xenotransplante para camundongos imunodeficientes (NCr nu/nu) inférteis. Para tal, a seleção de um

marcador de membrana específico para estas células fez-se necessário, em virtude de que o isolamento das mesmas seria feito via citometria de fluxo ativada por fluorescência (FACS). Neste cenário, o marcador TSPAN33 vêm sendo identificado, via ensaios moleculares, como gene exclusivamente expresso em espermatogônias humanas primitivas de reserva (Guo et al. 2018; Sohni et al., 2019; Tan et al., 2020). Desse modo, realizou-se IHC para este receptor de membrana e constatou-se que, apesar de ser expresso pela quase totalidade das A_{eVac} (94%), ele não está restrito a este fenótipo, sendo também encontrado nas demais espermatogônias de forma reduzida e gradativa, na medida em que progredimos entre os fenótipos $A_{eVac} > A_{eNoVac} > A_{clara} > B$. Apesar de estar em contradição com os achados moleculares prévios (Guo et al., 2018; Sohni et al., 2019), este dado vai de acordo com imunomarcação para outro gene dito como exclusivo de espermatogônias primitivas, o PIWIL4 (Guo et al., 2018; Sohni et al., 2019). Trabalho de Shami et al. (2020) demonstrou que o receptor de membrana PIWIL4, assim como o TSPAN33 no presente trabalho, está presente em todos os fenótipos espermatogoniais, mas de forma reduzida naqueles mais ativos/diferenciados. Prováveis explicações para este antagonismo entre resultados moleculares e morfológicos residem no fato de que, enquanto a identificação/quantificação desses genes foi feita via sequenciamento de mRNA em células isoladas (*single cell RNA sequencing*), a imunolocalização é baseada na identificação da proteína resultante da tradução destes mRNA, na membrana celular. Portanto, não necessariamente mRNA e proteína derivada coexistem, em quantidades similares, num determinado período de desenvolvimento (revisão em Liu et al., 2016). Dessa forma, é possível que o receptor TSPAN33 coexista com seus transcritos codificantes em grandes quantidades nas espermatogônias primitivas (de reserva) e que, com a progressão/diferenciação espermatogonial com consequente regulação negativa de seu mRNA, sua presença na membrana celular reduz-se de forma atrasada e gradativa, com o tempo (Le Roch et al., 2004; Lee et al., 2011).

Em seguida, prosseguiu-se com a caracterização da população de espermatogônias TSPAN33 através da determinação da sua atividade mitótica (MCM7) e identificação da expressão dos marcadores espermatogoniais UTF1,

GFRA1 e c-KIT. A taxa de proliferação observada para as espermatogônias TSPAN33+ foi baixa (21%), especialmente se comparada com aquelas de outros marcadores espermatogoniais obtidos no presente trabalho (UTF1 - 21%, GFRA1 - 39% e c-KIT - 64%). Adicionalmente, notou-se redução gradativa da co-localização de TSPAN33 com os marcadores UTF1 (77%), GFRA1 (63%) e KIT (14%), respectivamente, confirmando seu status de subpopulação espermatogonial mais indiferenciada, com baixa atividade mitótica, em congruência com estudos recentes na literatura (Guo et al. 2018; Sohni et al., 2019; Tan et al., 2020).

Após esta definição, visando determinar a funcionalidade tronco das espermatogônias TSPAN33, selecionou-se, para via de comparação, outro marcador de espermatogônias indiferenciadas com alto potencial tronco: o SSEA4. Estudos anteriores demonstraram que as espermatogônias SSEA4 expressam, na sua grande maioria, outros marcadores indiferenciados tais como GFRA1 e GPR125 e apresentam elevada capacidade de proliferação *in-vitro* e em testículos de camundongos após xenotransplante (Izadyar et al., 2011; Kokkinaki et al., 2011). No entanto, através de análise moleculares, mostrou-se que espermatogônias primitivas, incluindo as TSPAN33, pouco expressam SSEA4 (Guo et al., 2018). Neste contexto, no presente trabalho buscou identificar o SSEA4, via IHC e IF, nos diferentes fenótipos espermatogoniais, no entanto, apenas marcações inespecíficas polarizadas em partes do citoplasma foram observadas (dados não apresentados), o que está de acordo com dados prévios de Kokkinaki e colaboradores (2011). Dessa forma, inviabilizou-se análises morfofuncionais semelhantes aquelas efetuadas para o TSPAN33.

Subsequente a incubação da suspensão de células testiculares com anticorpos anti-TSPAN33 e anti-SSEA4, isolou-se as espermatogônias via FACS em cinco grupos: células não triadas, TSPAN33+/SSEA4-, TSPAN33+/SSEA4+, TSPAN33-/SSEA4+ e TSPAN33-/SSEA4-. Após dois meses do xenotransplante, as espermatogônias TSPAN33+ apresentaram baixo potencial de colonização e proliferação no testículo de camundongos, visto que além do reduzido número de células presentes, elas foram encontradas, na sua maioria, como células isoladas e uma pequena fração na forma pareada. Este achado sugere que as

espermatogônias TSPAN33 falharam em proliferar-se/diferenciar-se pois, conforme demonstrado por estudo morfofuncional recente de Di Persio et al (2017), quanto maior o sincício em que uma espermatogônia se encontra, maior a chance dela se encontrar em um estado diferenciado (c-KIT+).

Em contrapartida, comprovamos que as espermatogônias SSEA4+ possuem um alto potencial de espermatogônia-tronco, sendo capaz de produzir sincícios de até 16 células em um ambiente permissivo, conforme descrito por Izadyar et al. (2011). Ademais, o presente trabalho evidenciou de forma inédita que, para ser altamente eficiente em termos de colonização, as espermatogônias devem expressar exclusivamente o gene SSEA4 pois, o simples fato de expressar em conjunto o TSPAN33 (TSPAN33+/SSEA4+) reduz seu potencial de SSC após xenotransplante. Este achado sugere que a expressão de marcadores altamente indiferenciados, presente em espermatogônias relativamente quiescentes, as tornam células-tronco com baixo potencial para transplantes, além de demonstrar que, para este fim, aquelas indiferenciadas com elevada taxa de proliferação, tem melhor desempenho. Neste sentido, estudos morfofuncionais futuros devem ser realizados para melhor caracterizar a população espermatogonial SSEA4+ e identificar quais seriam os fenótipos que a expressam, dessa forma, abrindo caminhos para futuras aplicações clínicas das respectivas espermatogônias.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram, pela primeira vez em humanos, que as espermatogônias mais indiferenciadas e de reserva da espermatogênese não correspondem a toda população de A_{escura} , mas sim a uma subpopulação de sua variação morfológica com vacúolo nuclear (A_{eVac}), as espermatogônias $A_{\text{eVac}} \text{ UTF1+ / GFRA1- / KIT- / MCM7-}$. Além disso, apresentamos fortes evidências de que espermatogônias primitivas TSPAN33+ , que possuem baixa taxa de proliferação, não apresentam desejável atividade de células-tronco ativas após xenotransplante para camundongos imunodeficientes inférteis. Dessa forma, estes achados servem como base para investigações futuras que visam não somente decifrar a dinâmica espermatogonial humana, mas também identificar quais seriam as melhores espermatogônias para aplicações clínicas relacionadas a fertilidade masculina.

8 REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **The Anatomical Record**. v. 94, n. 2, p. 239-247, 1946.

AMANN, R. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. **American Journal of Anatomy**. v. 110, n. 1, p. 49-67, 1962.

BIE, B., et al. Noncoding RNAs: Potential players in the self-renewal of mammalian spermatogonial stem cells. **Molecular Reproduction and Development**. v. 85(8-9), p. 720-728, 2018.

BLOW, J. J.; HODGSON, B. Replication licensing – origin licensing defining the proliferative state? **Trends in Cell Biology**. v. 12, p. 72–78, 2002.

BRANCA, A. Les canalicules testiculaires et la spermatogenese de l'homme. **Arch Zoo**. V. 62, p. 53-252, 1924.

BRINSTER, R. L., AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 91, p. 11303–11307, 1994.

BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 91, p. 11298–11302, 1994.

BRINSTER, R. L. Male germline stem cells: from mice to men. **Science**. V. 316, p.404–405, 2007.

BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Proliferation**. v. 25, p. 31–40, 1992.

CALDEIRA-BRANT, A. L. et al., A subpopulation of human Adark spermatogonia behaves as the reserve stem cell. **Reproduction**. v. 159, p. 437-451, 2020.

CALDEIRA-BRANT, A. L. et al., Spermatogonial behavior in marmoset: a new generation, their kinetics and niche. **Molecular Human Reproduction**. v. 24, p. 299-309, 2018.

CAIRES, K. C., et al. VEGFA Family isoforms regulate spermatogonial stem cell homeostasis in vivo. **Endocrinology**. v. 153, p. 887–900, 2012.

CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. **Biology of Reproduction**. v. 65, p. 1175-1178, 2001.

CHIARINI-GARCIA, H; RAYMER, M; RUSSELL, L. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. **Reproduction**. v. 126, n. 5, p. 669-680, 2003.

CHIARINI-GARCIA, H; MEISTRICH, M. L. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. **Methods in Molecular Biology**. v. 450, p. 95-107, 2008.

CHIARINI-GARCIA, H., et al. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1-2, p. 139-154, 2009.

CHIARINI-GARCIA, H., et al. Influence of three different histological methods on the morphology and morphometrical data in human testis. **Histology and Histopathology**. v. 32, p. 27-34, 2017.

CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.; Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macaca rhesus*. **American Journal of Anatomy**. v. 104, p. 237–273, 1959.

CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. **American Journal of Anatomy**. v. 112, n. 1, p. 35-51, 1963.

CLERMONT, Y. Renewal of spermatogenesis in man. **American Journal of Anatomy**. v. 118, p. 509–524, 1966.

CLERMONT, Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). **American Journal of Anatomy**. v. 126, p. 57-71, 1969.

CLERMONT, Y.; ANTAR, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. **American Journal of Anatomy**. v. 135, p. 153-165, 1973.

COM, E., et al. Identification, molecular cloning, and cellular distribution of the rat homolog of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) in the rat testis. **Molecular Reproduction and Development**. v.73, p. 866–877, 2006.

COSTA, G. M. J., et al. Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e44091, 2012.

DE FALCO, T., et al. Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. **Cell Reports**. v. 12, n. 7, p.1107-1119, 2015.

DE ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. **International Journal of Experimental Pathology**. V. 79, p. 67–80, 1998.

DE ROOIJ, DG.; RUSSELL, LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**. v. 21, p. 776-798, 2000.

DI PERSIO, S., et al. Spermatogonial kinetics in humans. **Development**. v. 144, p. 3430-3439, 2017.

DRUMOND, A., et al. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. **Reproductive Toxicology**. v. 32, n. 4, p. 395-406, 2011.

DO NASCIMENTO, H. F., et al. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 5, p. 486-497, 2009.

EHMCKE, J; LUETJENS, CM; SCHLATT, S. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human

primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 293-300, 2005.

EHMCKE, J.; SCHLATT, S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. **Reproduction**. v. 132(5), p. 673-680, 2006.

FAYOMI, A; ORWIG, K. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. **Stem Cell Research**. v. 29, p. 207-214, 2018.

FOUQUET, J. P.; DADOUNE, J. P. Renewal of spermatogonia in the monkey (*Macaca fascicularis*). **Biology of Reproduction**. v. 35, p. 199-207, 1986.

FRANÇA, L. R., et al. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**. v. 4, p. 189-212, 2016.

GRISWOLD, M. D. et al. Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 564, p. 154-172, 1989.

GRISWOLD, M. D.; HOGARTH, C. Beyond stem cells: Commitment of progenitor cells to meiosis. **Stem Cell Research**. v. 27, p. 169-171, 2018.

GUO, J., et al. Chromatin and Single-Cell RNA-Seq Profiling Reveal Dynamic Signaling and Metabolic Transitions during Human Spermatogonial Stem Cell Development. **Cell Stem Cell**. v. 21(4), p. 533-546, 2017.

GUO, J., et al. The adult human testis transcriptional cell atlas. **Cell Research**. v. 28(12), p. 1141-1157, 2018.

GUL, M., et al. Review of injection techniques for spermatogonial stem cell. **Human Reproduction Update**. v. 26(3), p. 368-391, 2020.

HAIDER, S. G., et al. Description of eight phases of spermiogenesis in the marmoset testis. **Acta Anatomy**. v.135, p. 180-184, 1989.

HELLER, C; CLERMONT, Y. Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. **Science**, v. 140, n. 3563, p. 184-186, 1964.

HERMANN, B. P., et al. Characterization, cryopreservation and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. **Stem Cells**. V. 25(9), p. 2330-2338, 2007.

HERMANN, B. P., et al. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. **Human Reproduction**. v. 24, p. 1704-1716, 2009.

HERMANN, B. P., et al. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? **Reproduction**. v. 139, p. 479-493, 2010.

HERMANN, B. P., et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. **Cell Stem Cell**. v.11, p. 715–726, 2012.

HERMANN, B. P., et al. The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. **Cell Reports**. V. 25(6): p. 1650-1667.e8, 2018.

HOLT, WV; MOORE, H. D. M. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Anatomy**, v. 138, p. 175-188, 1984.

IZADYAR, F., et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. **Reproduction**. v. 126, p. 765–774, 2003.

IZADYAR, F., et al. Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. **Human Reproduction**. v. 26(6), p. 1296-1306, 2011.

JAMIN S., et al. EXOSC10/Rrp6 is post-translationally regulated in Male germ cells and controls the onset of spermatogenesis. **Scientific Reports**. v. 7(1). 15065, 2017.

JAN, S., et al. Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. **Development**. v. 144(20), p. 3659-3673, 2017.

KANATSU-SHINOHARA, M., et al. Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. **Biol Reprod**. v. 68, p. 167–173, 2003.

KITADATE, Y., et al. Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche. **Cell Stem Cell**. v. 24(1), p. 79-92e6, 2019.

LE ROCH, K. G., et al. Global analysis of transcript and protein levels across the plasmodium falciparum life cycle. **Genome Res**. v. 14, p. 2308-2318, 2004.

LEAL, M; FRANÇA, R. The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) Is Similar to Humans. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 4, p. 616-624, 2006.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definitions of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 55, p. 548-573, 1952.

LEE, M. V., et al. A dynamic model of proteome changes reveals new roles for transcript alteration in yeast. **Mol Syst Biol**. v.7, p.514, 2011.

LIU, Y.; BEYER, A.; AEBERSOLD, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. **Cell**. v. 165(3), p. 535-550, 2016.

LOK, D.; WEENK, D.; DE ROOIJ, D. G. Morphology, proliferation, and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster and the ram. **Anatomical Record**. v. 203, p. 83–99, 1982.

LU, N. Loss of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) isoforms in the testes of male mice causes subfertility, reduces sperm numbers, and alters expression of genes that regulate undifferentiated spermatogonia. **Endocrinology**. v. 154, p. 4790–4802, 2013.

LUETJENS, C. M.; WEINBAUER, G.; WISTUBA, J. Primate Spermatogenesis: new insights into comparative testicular organisation, spermatogenic efficiency and endocrine control. **Biological Reviews**. v. 80, n. 03, p. 475, 2005.

MENG X., et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. **Science**. V. 287, p. 1489-1493, 2000.

MILLAR, M. R., et al. Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. **International Journal of Andrology**. v. 23, n. 5, p. 266-277, 2000.

MAKI, C. B., et al. Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes. **Hum. Reprod**. v. 24, p. 1480–1491, 2009.

MEDRANO, J. V., et al. Germ cell transplantation into mouse testes procedure. **Fertil Steril** v. 102, p. e11-e12, 2014.

MOORE, A.; MORRIS, I. D. The involvement of insulin-like growth factor-1 in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. **Journal of Endocrinology**. V. 138, v. 107-114, 1993.

NICKKHOLGH B., et al. Enrichment of spermatogonial stem cells from long-term cultured human testicular cells. **Fertil Steril** v. 102, p. 558–565.e5, 2014.

NIHI, F., et al. Revisiting the human seminiferous epithelium cycle. **Human Reproduction**, v. 32(6), p. 1170-1182, 2017.

OAKBERG, E. F. Effects of radiation in the testis. In: Hamilton, D.W., Greep, R.O (Eds). **Handbook of Physiology**. American Physiology Society., Washington DC (Section 7), 1975.

OATLEY, J. M., et al. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. **Development**. v. 136, p. 1191-1199, 2009.

OGAWA, T., et al. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. **Int J Dev Biol**. v. 41, p. 111–122, 1997.

POHL, E. et al. Ageing in men with normal spermatogenesis alters spermatogonial dynamics and nuclear morphology in Sertoli cells. **Andrology**. v.7, p.827–839, 2019.

POTTER, S.; DE FALCO, T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. **Reproduction**. v. 153, n. 4, p. R151-R162, 2017.

REIS, M. M., et al. Xenogeneic transplantation of human spermatogonia. **Zygote**. V. 8, p. 97–105, 2000.

REZENDE-MELO, C., et al. Spermatogonial asynchrony in Tex14 mutant mice lacking intercellular bridges. **Reproduction**. v. 160, p. 205-215, 2020.

ROOSEN-RUNGE, E. C.; BARLOW, F. D. Quantitative studies on human spermatogenesis. **American Journal of Anatomy**. v. 93(2), p. 143-169, 1953.

RUSSELL, L. D., et al. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Cache River Press, Clearwater. 286p. 1990.

SHAMI, A. N. et al., Single-Cell RNA Sequencing of Human, Macaque, and Mouse Testes Uncovers Conserved and Divergent Features of Mammalian Spermatogenesis. **Dev Cell**. v. 54(4): p. 529-547, 2020.

SHARMA, S. et al. Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance. **Human Reproduction Update**. v. 25(3): p. 275-297, 2020.

SHARPE, R. M., et al. Regulation of spermatogenesis. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press; p. 1363–1394, 1994.

SHETTY, G.; MEISTRICH, M. The Missing Niche for Spermatogonial Stem Cells: Do Blood Vessels Point the Way? **Cell Stem Cell**. v. 1(4), p. 361-363, 2007.

SOHNI, A. et al. The neonatal and adult human testis defined at the single-cell level. **Cell Reports**. v. 26: p. 1501-1517, 2019.

SPRADLING, A; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells finds their niche. **Nature**, v. 414, p. 98-104, 2001.

TAN, K. Transcriptome profiling reveals signaling conditions dictating human spermatogonia fate in vitro. **PNAS**. V. 117(30), p. 17832-17841, 2020.

TSAI, R. Y. L.; KITTAPPA, R.; MCKAY, D. G. Plasticity, niches, and the use of stem cell. **Developmental Cell**. v. 2, p. 707-712, 2002.

VALLI, H., et al. Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. **Fertility and Sterility**. v. 102(2), p. 566-580e.7, 2014.

VAN ALPHEN, M.; VAN DE KANT, H.; DE ROOIJ, D. Depletion of the Spermatogonia from the Seminiferous Epithelium of the Rhesus Monkey after X Irradiation. **Radiation Research**. v. 113, n. 3, p. 473, 1988.

VAN BEEK, M. E., et al. Response to fission neutron irradiation of spermatogonial stem cells in different stages of the cycle of the seminiferous epithelium. **Radiation Research**. v. 97, p. 556–569, 1984.

VON KOPYLOW, K. et al. Differential marker protein expression specifies rarefaction zone-containing human Adark spermatogonia. **Reproduction**. v. 143(1), p.45-57, 2012a.

VON KOPYLOW, K. et al. Fibroblast growth factor receptor 3 is highly expressed in rarely dividing human type A spermatogonia. **Histochemistry and Cell Biology**. v.138, p.759-772, 2012b.

WANG M. et al. Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis. **Cell Stem cell**. v. 23, p. 599-614, 2018.

WATT, F.M.; HOGAN, B.L.M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

WEINBAUER, G. Quantitative Analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. **Biology of Reproduction**. v. 64, n. 1, p. 120-126, 2001.

WU, X., et al. Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. **Human Reproduction**. v. 27, p.1249–1259, 2012.

YOSHIDA, S; SUKENO, M; NABESHIMA, Y. A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1722-1726, 2007.

ZHAO, G.; GARBERS, D. Male germ cell specification and differentiation. **Development Cell**. v. 2, p. 537-547, 2002.

ZINDER, J. C.; LIMA C. D. Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. **Gene & Development**. v. 31, p. 88-100, 2017.

ZOHNI, K. X., et al. CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes. **Biol. Reprod.** v. 87, p. 27 2012.

A subpopulation of human A_{dark} spermatogonia behaves as the reserve stem cell

A L Caldeira-Brant¹, L M Martinelli¹, M M Marques¹, A B Reis², R Martello³, F R C L Almeida¹ and H Chiarini-Garcia¹

¹Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução – ICB-UFMG, Belo Horizonte, Brasil, ²Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, UFGM, Belo Horizonte, Brasil and ³Serviço de Nefrologia e Urologia do Hospital das Clínicas da UFGM, Belo Horizonte, Brasil

Correspondence should be addressed to H Chiarini-Garcia; Email: heliochiarini@gmail.com

Abstract

Human spermatogonial stem cells (SSCs) are an essential source to maintain spermatogenesis as an efficient process for daily sperm production with high self-renewal capacity along adulthood. However, the phenotype and the subpopulation that represent the real reserve SSC for the human testis remain unknown. Moreover, although SSC markers have been described for undifferentiated spermatogonia (A_{dark} and A_{pale}), the existence of a specific subtype that could be identified as the actual/true SSC has not yet been fully determined. Herein we evaluated spermatogonial morphology, kinetics, positioning regarding blood vasculature in relation to protein expression (UTF1, GFRA1, and KIT) as well as proliferative activity (MCM7) and identified a small subpopulation of A_{dark} with nuclear rarefaction zone (A_{dVac}) that behaves as the human reserve SSC. We show that A_{dVac} is the smallest human spermatogonial population (10%), staying quiescent (89%) and positioned close to blood vessels throughout most of the stages of the seminiferous epithelium cycle (SEC) and divides only at stages I and II. Within this A_{dVac} population, we found a smaller pool (2% of A_{dVac}) of entirely quiescent cells exhibiting a high expression of UTF1 and lacking GFRA1. This finding suggests them as the real human reserve SSC (A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻). Additionally, A_{dark} without nuclear vacuole (A_{dNoVac}) and A_{pale} have similar kinetic and high proliferative capacity throughout the SEC (47%), indicating that they are actively dividing undifferentiated spermatogonia. Identification of human stem cells with evident reserve SSC functionality may help further studies intending to sort SSCs to treat male diseases and infertility.

Reproduction (2020) **159** 437–451

Introduction

Human spermatogonial stem cells (SSCs) are adult progenitor cells of the postnatal testis and the foundation of the spermatogenic process. Determining the behavior of SSCs is one of the most exciting challenges of reproductive biology since it is directly related to sperm production (reviewed in [Fayomi & Orwig 2018](#), [Sharma et al. 2019](#)). Although previous studies have brought new information about the complexity of human spermatogenesis ([von Kopylow et al. 2012a,b](#), [Di Persio et al. 2017](#), [Guo et al. 2018](#), [Hermann et al. 2018](#), [Sohni et al. 2019](#)), knowledge about the proliferative or spermatogonial phase of this process is still scarce.

Since [Clermont \(1963\)](#), it has been accepted that the human spermatogonial population is morphologically divided into three classes: two types A undifferentiated (A_{und}) known as A dark (A_{dark}) and A pale (A_{pale}) and one differentiating type B (B) spermatogonia. Thereafter, it was shown that A_{dark} can present two phenotypes,

with or without a nuclear rarefaction zone ([Paniagua et al. 1986](#), [Nihi et al. 2017](#)). Different models have tried to describe human A_{und} spermatogonia dynamics suggesting A_{dark} ([Clermont 1966a,b](#)) or A_{pale} ([van Alphen et al. 1988](#)) as the true stem cells or considering A_{dark} and A_{pale} as belonging to the same cell generation, albeit in different phases of the cell cycle ([Fouquet & Daudone 1986](#), [Hermann et al. 2009](#)). Moreover, previous studies showed that the A_{dark} subtype with nuclear rarefaction zone express specific undifferentiated spermatogonial markers and is relatively quiescent ([von Kopylow et al. 2012a,b](#), [Pohl et al. 2019](#)). Despite these advances, there is not enough information regarding the human spermatogonial population dynamics and, importantly, whether there is any specific self-renewing and/or reserve SSC population.

Aiming to better understand the human spermatogonial behavior, especially the SSCs, studies using molecular assays revealed heterogeneous and transitional populations expressing different protein markers along the proliferative phase ([Jan et al. 2017](#),

Neuhaus *et al.* 2017, Guo *et al.* 2018, Hermann *et al.* 2018, Sohni *et al.* 2019). Although these works uncovered genes exclusively expressed in human SSCs, suggesting at least three different functional states, none of them were correlated with any specific A_{und} spermatogonial phenotype such as the classical A_{dark} and A_{pale} or the A_{dark} (with and without nuclear rarefaction zone) subtypes. Thus, even in light of the most recent molecular and genetic findings regarding non-human and human spermatogonia (reviewed in Sharma *et al.* 2019), we still do not know the morphological identity of the true human SSC.

Studying the New World primate black-tufted marmoset, Caldeira-Brant *et al.* (2018) revealed two A_{dark} spermatogonial subtypes, with (A_{dVac}) and without (A_{dNoVac}) nuclear rarefaction zone. They also showed that the A_{dVac} presented a peculiar kinetic associated with a smaller population along the seminiferous epithelium cycle (SEC) and positioning closer to blood vessels when compared to A_{dNoVac} and A_{pale} . Such findings demonstrated, for the first time in non-human primates, that a subpopulation of A_{dark} behaves differently than other A_{und} spermatogonia, suggesting it as the reserve SSC in this primate. Because the spermatogenic process of this species is comparable to human (Wistuba *et al.* 2003) and in light of recent findings regarding the quiescent state of the human A_{dVac} (von Kopylow *et al.* 2012a,b) prompted the question of whether the human A_{dVac} spermatogonia could exhibit similar behavior.

Therefore we evaluated the behavior of human spermatogonial population along the SEC, addressing the two subtypes of A_{dark} spermatogonia (with and without a nuclear rarefaction zone), in terms of kinetic, expression of the markers UTF1/GFRA1 for SSC, MCM7 for proliferation and positioning in relation to blood vasculature (niche). The present study strongly suggests that within the morphological A_{dVac} subtype there is a small subpopulation that behaves as the human reserve SSC.

Materials and methods

Ethical approval and patient selection

Collection of testis samples were approved by the Ethical Research Committee (COEP) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (ETIC n° 032/04 and n° 117/07). All patients had bilateral testicular orchiectomy due to prostate cancer and, before surgery, were informed about the research purpose and formally agreed to donate their testes.

In the present study, patients were selected based on the following parameters: age (<60 years old), well-preserved testicular parenchyma, paternity and normal levels of sexual hormones: FSH (3.32 ± 1.35 mUI/mL), LH (4.02 ± 0.12 mUI/mL) and testosterone (392 ± 74 ng/dL). Hormonal values are expressed as mean \pm S.D.

Sample collection and histological preparation

Testes were obtained from five patients, with an average age of 50 ± 10 years old, who underwent bilateral testicular orchiectomy due to prostate cancer and were not submitted to any other treatments prior to surgery at the University Hospital of UFMG. So far, the literature does not have any information about the harmful effects of prostate cancer on spermatogenesis. The testes weighing 22.2 ± 2.7 g (mean \pm S.D.) were cut into small fragments of 1–3 mm, which were fixed by immersion in two different fixatives depending on whether they were going to be processed for morphometrical evaluation under high-resolution light microscopy (HRLM) or immunostaining analysis. For HRLM analyses, the testis fragments were fixed in 5% glutaraldehyde (biological grade; Electron Microscopy Sciences, Hatfields, PA, USA) in 0.05M phosphate buffer (pH 7.3), post-fixed in reduced osmium (osmium tetroxide 1% and potassium ferrocyanide in 1.5%), embedded in Araldite resin and then sectioned at $1 \mu\text{m}$ thickness, as the best method for histomorphometrical evaluations (Chiarini-Garcia *et al.* 2017). For immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) analyses, the testis fragments were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3), embedded in paraffin and cut into $5 \mu\text{m}$ thickness.

Nucleus and nuclear rarefaction zone (nuclear vacuole) characterization of A_{dVac} spermatogonia

First, diameters of the nucleus and the nuclear vacuole (mean value of two perpendicular axes) of A_{dVac} as well as the diameter of the nuclei of A_{dNoVac} , A_{pale} and B spermatogonia were determined using the Olympus BX-51 microscope in testis processed for HRLM. Approximately 80 cells were measured for each cell type per patient using the Image-Pro Express software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Results are presented as mean \pm S.E.M. ($n=5$).

To determine the smallest histological profile in which nuclear vacuole is observed into the nucleus of A_{dVac} , we used a thick paraformaldehyde-fixed and paraffin-embedded histological section ($10 \mu\text{m}$) and took at least ten photomicrographs from each A_{dVac} at different focus depths (from one nuclear pole to the other) under phase-contrast light microscopy (Olympus BX-51 microscope) (Fig. 1D, E, F, G and H). When the nuclear vacuole was no longer observed, the mean size of the nuclear histological section (mean value of two perpendicular axes) was obtained (Fig. 1D' and H'). The results were presented as mean \pm S.E.M. from ~ 50 A_{dVac} per patient ($n=5$).

The area and volume of A_{dVac} nucleus and its nuclear vacuole were determined through a 3D Z-stack reconstruction from a $10 \mu\text{m}$ thickness cross-section, immunostained with the specific nuclear rarefaction zone marker EXOSC10 (von Kopylow *et al.* 2012a) and DAPI for DNA staining (Fig. 1J and K). For each A_{dVac} evaluated, 100 consecutive z-series of 2D images were collected using a x63 objective, and a z-axis step of $0.1 \mu\text{m}$ was obtained using a Zeiss Apotome microscope. The nucleus/vacuole area and volume were determined through the 'Measure Stack' plugin of the Image J Software (NIH, USA). The area was obtained from the biggest z-series 2D section. Results were presented as mean \pm S.E.M. from eight A_{dVac} per patient ($n=3$).

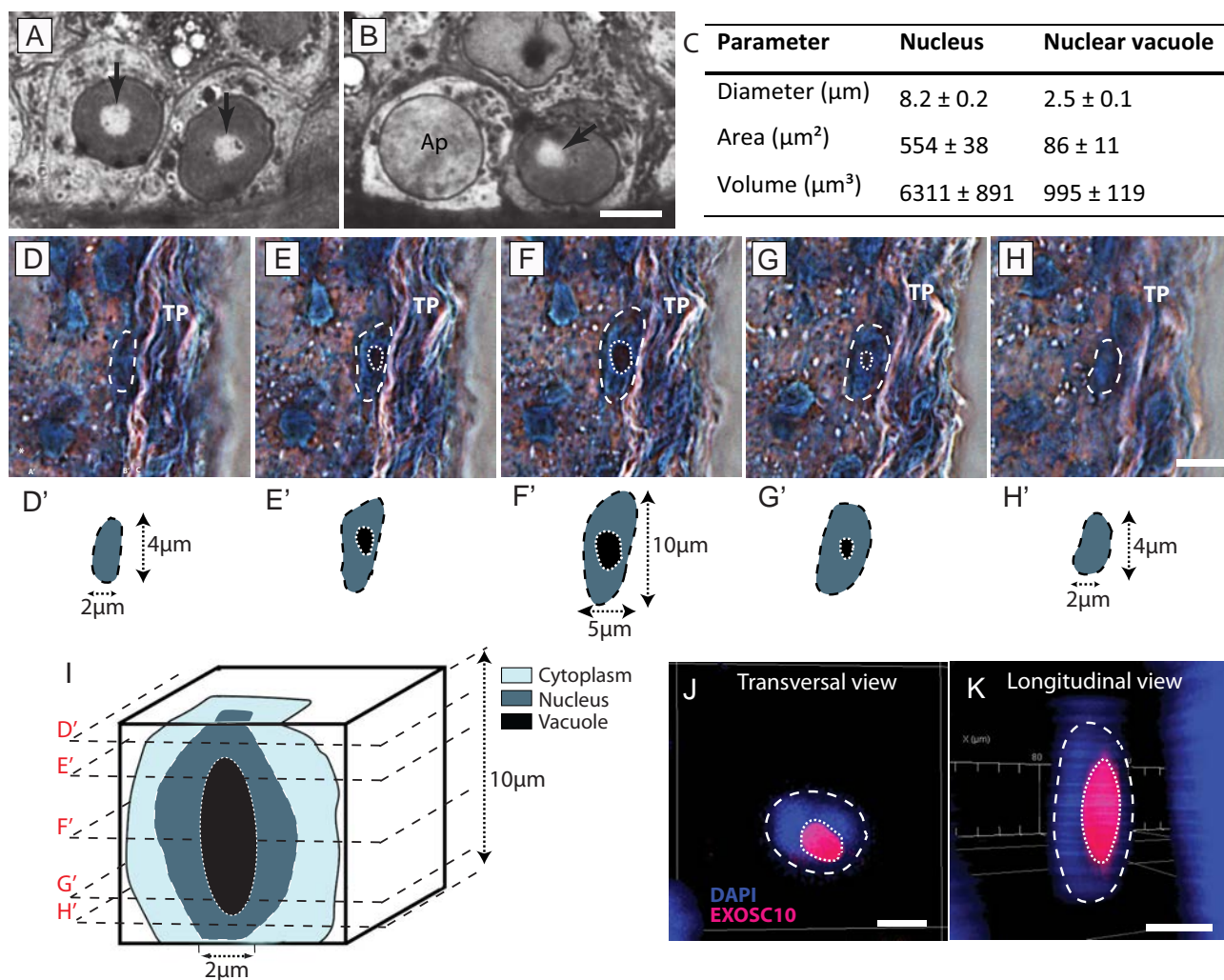


Figure 1 Morphological description of A_{dVac} spermatogonia nucleus and nuclear vacuole. HRLM photomicrographs of A_{dVac} containing (A) central and (B) peripheral nuclear vacuole (arrows). (C) A_{dVac} nucleus and nuclear vacuole morphological parameters (mean \pm S.E.M.). (D, E, F, G and H) Sequential photomicrographs showing morphological aspects of a A_{dVac} spermatogonium nucleus and nuclear vacuole. (D', E', F', G' and H') Schematic drawings of the A_{dVac} spermatogonium nucleus and nuclear vacuole from D–H photomicrographs and (I) a 3D reconstruction of a paraffin section, showing that the nuclear vacuole is not often observed in histological sections of $\leq 3 \mu\text{m}$ thickness (D' and H' in red). Transversal (J) and longitudinal (K) immunofluorescent images from a 3D Z-stack reconstruction of a A_{dVac} spermatogonium, showing the morphological characteristics of its nucleus and nuclear vacuole identified by DAPI and EXOSC10, respectively. Dashed line, nucleus delimitation; dotted line, nuclear vacuole delimitation; Ap, A_{pale} ; TP, tunica propria. Scale bars: $5 \mu\text{m}$.

Morphometrical evaluation under high-resolution light microscopy (HRLM)

To determine spermatogonial kinetics, the numbers of all spermatogonial subtypes as well as the numbers of spermatogonial mitosis and apoptosis, were counted in all the six stages of the SEC, as classically defined by Clermont (1963) and re-evaluated under HRLM by Nihi et al. (2017).

The number of spermatogonial subtypes (A_{dVac} , A_{dNoVac} , A_{pale} and B) and preleptotene spermatocytes (Pl) in a sample of 450 cells/patient ($n=5$) were determined. Small nuclear profiles of all spermatogonial subtypes presenting diameter with $\leq 3 \mu\text{m}$ were not counted (see Result section and Fig. 1). The numbers were corrected for section thickness and nuclear diameter, according to Abercrombie (1946) and as modified by Amann

& Almquist (1962). Next, the number of Sertoli cell nucleoli (SCN) was counted and corrected in the same way. The numbers of each spermatogonial subtype and preleptotene spermatocytes were equalized in relation to 100 SCN for all six stages of the SEC.

To determine the number of spermatogonial mitosis and apoptosis, at least 30 sections of seminiferous tubules per patient ($n=5$) were analyzed. Further, the SCN numbers were determined, and the obtained value was used to level the number of mitotic and apoptotic spermatogonia per 100 SCN. It was not possible to distinguish the spermatogonial subtypes considering the changes in nuclear morphology during the mitotic and apoptotic processes. Thus, their numbers corresponded to the sum of all spermatogonia undergoing those processes, observed at each of the six stages of the SEC.

Table 1 Description of the primary antibodies used in the immunohistochemistry and immunofluorescence analysis.

Antigen	Company	Code	Species	Clonality	Dilution
MCM7	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab2360	Mouse	Monoclonal	1:100
MCM7	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab52489	Rabbit	Monoclonal	1:100
UTF1	Chemicon, Temecula, CA, USA	MAB4337	Mouse	Monoclonal	1:200
GFRA1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	Sc-271546	Mouse	Monoclonal	1:200
GFRA1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	Sc-6157	Goat	Polyclonal	1:50
KIT	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	Sc-1494	Goat	Polyclonal	1:200
EXOSC10	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab50558	Rabbit	Polyclonal	1:50
EXOSC10 AF647	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	Sc-374595	Mouse	Monoclonal	1:50

Spermatogonial proliferation by immunohistochemistry (IHC)

The proliferative marker MCM7 was used to identify proliferating spermatogonia. Antigen retrieval was conducted using sodium citrate buffer (pH 6.0) in a microwave, followed by blocking of unspecific binding with 3% BSA in phosphate buffer (PBS, pH 7.3). Paraffin sections were incubated with the MCM7 (ab2360, Table 1) antibody in a humidified chamber overnight at 4°C. After binding of the biotinylated secondary goat anti-mouse antibody (BA-9200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 1:100), the sections were incubated with the ABC kit Vectastain (PK-6100, Vector Laboratories). The immunoreactivity was revealed with ImmPACT DAB (3,3'-diaminobenzidine) Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories) and sections were counterstained with hematoxylin. The negative control for the reaction was obtained by omitting the primary antibody.

Because MCM7⁺ spermatogonia have their nuclear morphology covered by the DAB reaction, it was difficult to differentiate A_{dark} from A_{pale} and B from preleptotene spermatocytes (Pl). Therefore, the paraffin-embedded germ cells were associated according to their morphology as follows: (a.) A_{dVac} spermatogonia (nuclear vacuole is still visible, even in MCM7⁺ cells); (b.) A_{dNoVac}+A_{pale} spermatogonia (A_{dNoVac}-A_{pale}); and (c.) type B spermatogonia+preleptotene spermatocytes (B-Pl), using conventional microscopy and phase-contrast light microscopy because the latter allowed better identification of the nuclear rarefaction zone. Subsequently, the numbers of MCM7⁺ and MCM7⁻ germ cell groups were counted, totalizing ~750 per patient (n=5). Using the Image-Pro Express software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA), the total length of the basement membrane of the seminiferous tubules was measured from the same tubules where spermatogonia and Pl were counted. Then, the number of the cell associations (A_{dVac}, A_{dNoVac}-A_{pale} and B-Pl) was determined per millimeter of the basement membrane of seminiferous tubules.

Expression of spermatogonial and proliferative markers through immunofluorescence (IF)

Paraformaldehyde-paraffin embedding sections were submitted to antigen retrieval in a microwave, immersed in sodium citrate buffer (pH 6.0). To reduce nonspecific binding, sections were incubated in 3% BSA (Sigma Aldrich) diluted in Tris-HCl buffer solution (TBS, pH 7.3). Subsequently, sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies listed in Table 1. After washing, species-specific secondary antibodies were

incubated for 90 min at 4°C. All secondary antibodies were Alexa Fluor 488, 555 and 647 (Thermo Fisher Scientific). Finally, the nuclei were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) and the slices were mounted with Dako fluorescent mounting medium (Dako North America). Pictures of double-immunolocalizations were acquired using a Zeiss Apotome microscope (Carl Zeiss) equipped with filters suitable to detect Alexa Fluor 488 and 555 signals. Pictures of triple-immunolocalization were acquired using the Fluorescent Nikon Eclipse Ti microscope, equipped with filters suitable for detection of Alexa Fluor 488, 555 and 647 signals. The negative control for the reaction was obtained by omitting the primary antibody.

Because in IF analysis it was not possible to recognize some spermatogonial phenotypes through nuclear DAPI staining (only A_{dVac} due to the evident nuclear vacuole), the germ cells counted at basement membrane of seminiferous tubules were grouped accordingly: for UTF1 and GFRA1 analyses as (a) A_{dVac} and (b) other spermatogonia (A_{dNoVac}, A_{pale} and B, hereafter identified as Other Spg) and, for KIT analysis, as (a) A_{dVac} and (b) other spermatogonia and preleptotene spermatocytes (Other Spg/Pl), as KIT is also expressed in Pl spermatocytes (Di Persio et al. 2017). The number of the germ cell groups counted for each marker (UTF1, GFRA1 and KIT) was determined per millimeter of the basement membrane of the seminiferous tubules, totalizing ~250 germ cell groups per patient (Table 2) For each marker (UTF1, GFRA1 and KIT) the proliferation index (%) was determined by dividing the number of MCM7⁺ germ cell groups expressing a marker by the sum of MCM7⁺ and MCM7⁻ expressing the same marker and multiplied per 100.

To determine the UTF1 fluorescence intensity, approximately 50 UTF1⁺ cells (A_{dVac} and Other Spg) were evaluated per patient. Before measurements, the Image J software (NIH) was equalized considering a known white as 100% and black as 0%. Next, the spermatogonial nuclei were outlined and the mean gray value of the fluorescence intensity was quantified. The values were expressed as mean % of fluorescence intensity. All digital images were obtained using the Nikon Eclipse Ti microscope under the same magnification and exposure conditions.

Spermatogonial positioning in relation to the blood vasculature

To investigate the position of each spermatogonial subtype in relation to the nearby blood vessels, we used the method in Caldeira-Brant et al. (2018). Briefly, 20 digital photomicrographs of the testicular parenchyma per patient were taken of HRLM and MCM7 immunostained slides from a site where the seminiferous tubules and adjacent

Table 2 Number of *A_{dVac}* and other spermatogonia/preleptotene spermatocytes (Others Spg/Pl) expressing UTF1, GFRA1 (undifferentiated) and KIT (differentiated) markers, alone or in combination, associated to their proliferative activity (MCM7) per millimeter of basement membrane of the seminiferous tubules (n°/mm).

UTF1 (n=5)		GFRA1 (n=5)		UTF1/GFRA1 (n=3)		GFRA1/KIT (n=3)		UTF1/KIT (n=3)	
Protein profile	n°/mm*	Protein profile	n°/mm	Protein profile	n°/mm	Protein profile	n°/mm	Protein profile	n°/mm
GC									
<i>A_{dVac}</i>									
UTF1-	NOB	GFRA1-/MCM7-	0.35 ± 0.10	UTF1-	NOB	GFRA1-/KIT-/MCM7-	0.54 ± 0.09	UTF1-	NOB
UTF1+/MCM7-	2.80 ± 0.40	GFRA1-/MCM7+	NOB	UTF1+/GFRA1-/MCM7-	0.68 ± 0.04	GFRA1-/KIT-/MCM7+	NOB	UTF1+/KIT-/MCM7-	2.95 ± 0.25
UTF1+/MCM7+	0.46 ± 0.12	GFRA1+/MCM7-	2.11 ± 0.42	UTF1+/GFRA1-/MCM7+	NOB	GFRA1+/KIT-/MCM7-	2.99 ± 0.10	UTF1+/KIT+/MCM7+	0.44 ± 0.09
		GFRA1+/MCM7+	0.50 ± 0.11	UTF1+/GFRA1+/MCM7-	3.22 ± 0.08	GFRA1+/KIT+/MCM7+	0.55 ± 0.13	KIT+	NOB
				UTF1+/GFRA1+/MCM7+	0.78 ± 0.09	KIT+	NOB		
Other Spg/Pl									
UTF1+/MCM7-	12.04 ± 1.40	GFRA1+/MCM7-	13.44 ± 2.77	UTF1+/GFRA1-/MCM7-	3.10 ± 0.70	GFRA1+/KIT-/MCM7-	15.55 ± 0.48	UTF1+/KIT-/MCM7-	13.77 ± 0.76
UTF1+/MCM7+	4.62 ± 0.48	GFRA1+/MCM7+	9.48 ± 2.16	UTF1+/GFRA1-/MCM7+	1.11 ± 0.09	GFRA1+/KIT-/MCM7+	8.98 ± 0.36	UTF1+/KIT+/MCM7+	4.99 ± 0.82
				UTF1+/GFRA1+/MCM7-	10.50 ± 1.41	GFRA1+/KIT+/MCM7-	1.76 ± 1.00	UTF1+/KIT+/MCM7-	0.87 ± 0.01
				UTF1+/GFRA1+/MCM7+	4.71 ± 0.82	GFRA1+/KIT+/MCM7+	1.74 ± 0.98	UTF1+/KIT+/MCM7+	2.07 ± 0.03
				UTF1-/GFRA1+/MCM7-	7.64 ± 0.74	GFRA1-/KIT+/MCM7-	4.94 ± 1.18	UTF1-/KIT+/MCM7-	4.34 ± 0.33
				UTF1-/GFRA1+/MCM7+	4.42 ± 0.45	GFRA1-/KIT+/MCM7+	9.17 ± 0.96	UTF1-/KIT+/MCM7+	11.80 ± 0.61
Total									
UTF1+	19.93 ± 3.37	GFRA1+	25.52 ± 4.41	UTF1+/GFRA1-	4.89 ± 0.65	GFRA1+/KIT-	28.07 ± 0.80	UTF1+/KIT-	22.14 ± 0.06
				UTF1+/GFRA1+	19.21 ± 1.60	GFRA1+/KIT+	3.50 ± 1.08	UTF1+/KIT+	2.94 ± 0.02
				UTF1-/GFRA1+	12.06 ± 0.97	GFRA1-/KIT+	14.12 ± 2.09	UTF1-/KIT+	16.14 ± 0.94

*Mean ± S.E.M.
GC, germ cell; Spg, spermatogonia; Pl, preleptotene spermatocyte; NOB, not observed; (n) number of patients.

interstitial tissue could be observed. The Image-Pro Express software was used to determine the distance from each human spermatogonial subtype (A_{dVac} , A_{dNoVac} , A_{pale} and B) and preleptotene spermatocytes identified by HRLM and groups of proliferating (MCM7⁺) or quiescent (MCM7⁻) spermatogonia (A_{dVac} , A_{dNoVac} - A_{pale} and B-PI) identified by IHC to the closest blood vessel (venule or capillary). The distances of ~700 germ cells were evaluated per patient considering the six stages of the SEC under HRLM, and ~750 germ cell groups (MCM7⁺ and MCM7⁻) were evaluated per patient in IHC sections ($n=5$).

Statistical analysis

All parameters in this study were tested for normality before analysis, and the data were examined as a completely randomized design, using the general linear model (GLM) procedure of the Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC, USA). Treatment effects were established by multiple comparisons using the probability of difference (pdiff) between means. Values of $P<0.05$ were considered significant. Data are presented as means \pm S.E.M.

Results

Characterization of the nucleus of A_{dVac} and its nuclear rarefaction zone (nuclear vacuole)

Under HRLM, the nuclei of A_{dVac} spermatogonia are somewhat flattened, oval-shaped, showing darkly stained and finely granulated chromatin. A single round vacuole is found centrally (Fig. 1A) or peripherally (Fig. 1B) positioned inside the nucleus. The A_{dVac} nucleus and its nuclear vacuole measure 8.2 ± 0.2 and 2.5 ± 0.1 μm , respectively (Fig. 1C). In comparison, the nuclear diameters of A_{dNoVac} , A_{pale} and type B spermatogonia measure 8.3 ± 0.2 μm , 9.3 ± 0.1 μm and 8.8 ± 0.3 μm , respectively, similarly as reported in Nihl *et al.* (2017). In histological sections, the nuclear vacuoles were not often observed in small A_{dVac} nuclear profiles measuring $\leq 3 \pm 0.4$ μm in diameter (Fig. 1D, E, F, G, H and I). Indeed, the probability of finding nuclear vacuoles in these small nuclear profiles was $3.5 \pm 0.9\%$ (9 in 250 A_{dVac} , $n=5$). Therefore, to avoid incorrect morphofunctional findings due to counting/antibody reading, we did not evaluate nuclear fragments measuring ≤ 3 μm in diameter in A_{dVac} and in all Other Spg/PI. Using 3D Z-stack reconstruction (Fig. 1J and K), the area of the largest 2D images from the z-series and volume of A_{dVac} nucleus and its nuclear vacuole were determined (Fig. 1C). The proportion that the nuclear vacuole occupies within A_{dVac} nucleus in relation to the diameter is 30%, to the area is 16% and to the volume is 19%.

Spermatogonial numbers and kinetic

Morphological identification under HRLM revealed the human spermatogonia as four subtypes. We found

three A undifferentiated (A_{und}) subtypes: two A_{dark} subpopulations, one with a single nuclear vacuole (A_{dVac} ; Fig. 2A) and another without a nuclear vacuole (A_{dNoVac} ; Fig. 2B), and one A_{pale} subtype (Fig. 2C). There is one differentiating subtype, the type B spermatogonia (B; Fig. 2D). Notably, the A_{dVac} is the smallest population in the testis, representing only 10% of human spermatogonia ($P<0.05$), whereas A_{dNoVac} corresponded to 22%. In contrast, A_{pale} is the largest spermatogonial population representing 40% ($P<0.05$) (Fig. 2E). The differentiating type B represents 28% as they are seen only at the stages VI to III of the SEC whereas undifferentiated subtypes are observed in all six stages.

Subsequently, the number of each spermatogonial subtype in relation to the SEC was determined. Once more, we observed that A_{dVac} presented low numbers and little variation along the SEC, being the smallest population at stages V and VI ($P<0.05$) (Fig. 2F). Although A_{dNoVac} showed a similar number as A_{dVac} in some stages (I–IV), the population varied similarly as A_{pale} , decreasing from stage VI up to III and progressively increasing thereafter (Fig. 2F). The numerical variation of A_{dNoVac}/A_{pale} and B spermatogonia and preleptotene spermatocytes presented consecutive waves (increasing/decreasing) of their populations along the spermatogenic cycle (Fig. 2G). When the numbers of A_{dNoVac}/A_{pale} started to fall, the pool of type B concomitantly grew (B peaks at stage II) and, while the number of type B was decreasing, preleptotene spermatocytes increased (PI peaks at stage III) (Fig. 2G).

Spermatogonial mitosis and apoptosis were counted at the basement membrane of the seminiferous tubules (Fig. 2H and I). Although mitoses were found in all stages of the SEC (Fig. 2J), high mitotic numbers were observed in the stages II–III, when B spermatogonia and preleptotene spermatocytes also reach their numerical peaks (Fig. 2G). Interestingly, spermatogonial mitosis increases progressively from stage IV up to stage VI (Fig. 2J), when the numbers of A_{dNoVac} and A_{pale} also frequently increase (Fig. 2F). Spermatogonial apoptosis were observed across all stages of the SEC (Fig. 2J), but no peculiar behavior was detected.

Spermatogonial proliferation

A_{dVac} proliferation was compared to A_{dNoVac} - A_{pale} and B-PI groups using MCM7 as a proliferative marker. Remarkably, the number of A_{dVac} MCM7⁺ was the lowest ($*P<0.05$) and corresponded to only 0.5% (0.21 ± 0.05 A_{dVac} MCM7⁺/mm) of the total spermatogonia-preleptotene counted (42.0 ± 4.3 spermatogonia-preleptotene/mm) at the basement membrane of seminiferous tubules (Fig. 3A). Additionally, it was observed that 89% of A_{dVac} were not proliferating (1.87 ± 0.35 A_{dVac} MCM7⁻/mm in a total of 2.08 A_{dVac} /mm) (Fig. 3B). Approximately half of the A_{dNoVac} - A_{pale} population showed mitotic activity, whereas B-PI population presented the highest

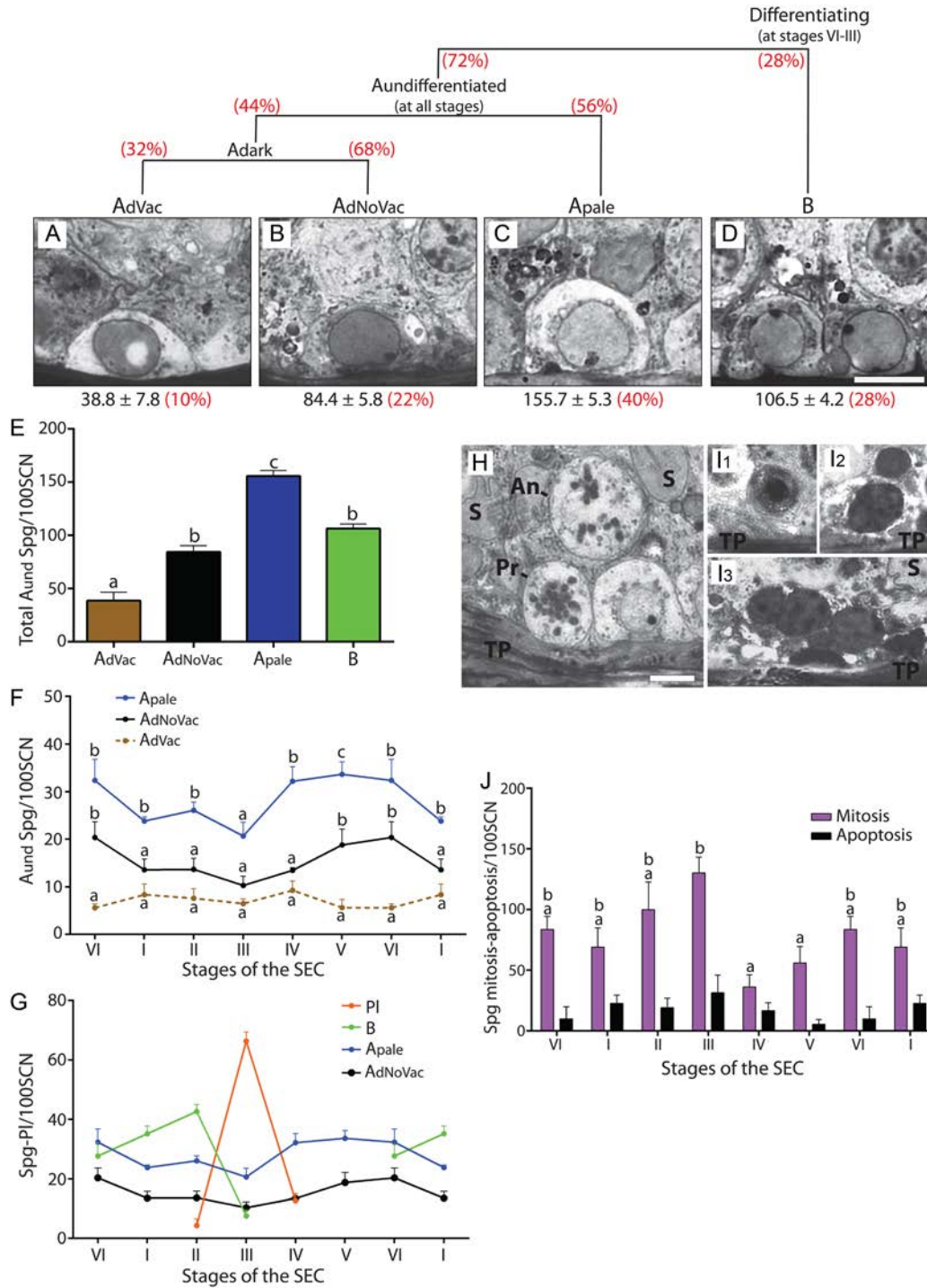


Figure 2 Identification and kinetic of human spermatogonial population ($n=5$). Photomicrographs under HRLM of the A undifferentiated (A_{und}) spermatogonial subtypes: (A) A_{dVac} A dark with nuclear vacuole; (B) A_{dNoVac} A dark without nuclear vacuole; (C) A_{paler} A pale and (D) differentiating type B and their respective population percentages (in parenthesis) in the testis (mean \pm S.E.M./100 Sertoli cell nucleoli – SCN). (E) Total number of spermatogonial subtypes in the testis (mean \pm S.E.M./100 SCN). Different letters (a–c) indicate statistical differences ($P < 0.05$). (F) Spermatogonial kinetic of A_{und} spermatogonia along the stages of the seminiferous epithelium cycle (SEC). Different letters (a–c) over the data points indicate significant differences ($P < 0.05$) in longitudinal comparisons within the same stage. (G) Spermatogonial kinetic of the A_{dNoVac} , A_{paler} , B spermatogonia and preleptotene spermatocytes (Pl) along the SEC (mean \pm S.E.M./100 SCN). (H) HRLM photomicrographs of spermatogonial mitosis in prophase (Pr) and anaphase (An) and (I1–I3) spermatogonial apoptosis. S, Sertoli cell; TP, tunica propria. (J) Number of spermatogonial mitosis and apoptosis along the SEC (mean \pm S.E.M./100 SCN). Different letters (a–b) indicate statistical differences among the stages of the SEC ($P < 0.05$). Scale Bars: 8 μ m.

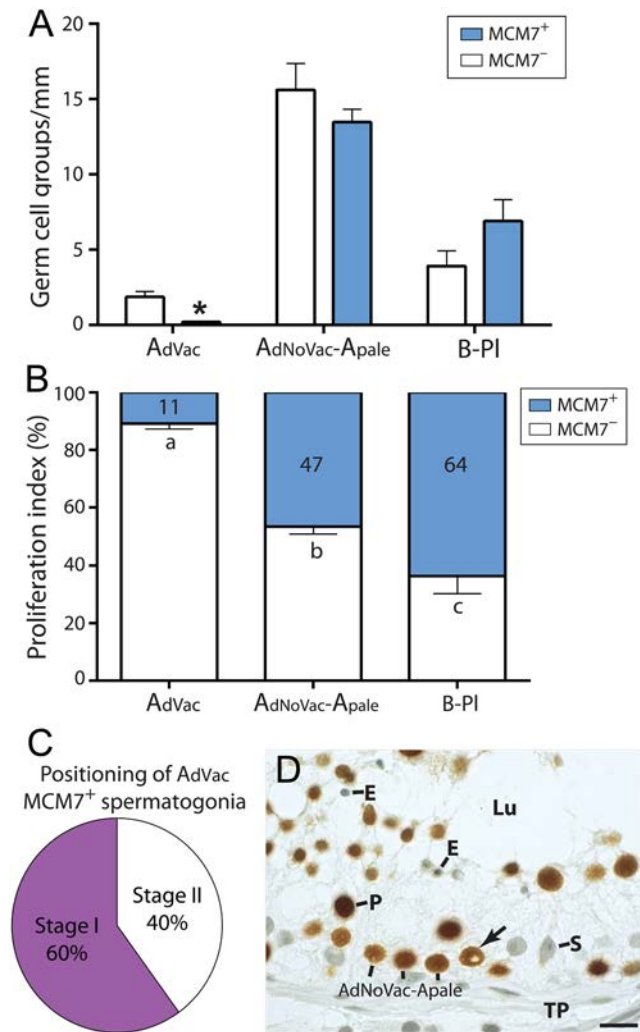


Figure 3 Human spermatogonial proliferation ($n=5$). (A) Number of MCM7⁺ and MCM7⁻ cells per millimeter (mm) of the seminiferous tubule basement membrane. The population of A_{dVac} MCM7⁺ spermatogonia/mm is smaller ($*P<0.05$) than the other cell groups evaluated. (B) Proliferation index showing that A_{dVac} spermatogonia presented the lowest mitotic activity. Different letters (a–c) indicate significant differences ($P<0.05$). (C) A_{dVac} MCM7⁺ spermatogonia were exclusively seen in stages I (D) and II of the SEC. Arrow, A_{dVac} MCM7⁺; S, Sertoli cell; P, pachytene spermatocyte; E, elongated spermatid; TP, tunica propria; Lu, lumen. Scale Bar: 20 μ m.

proliferation index (64%; $P<0.05$) (Fig. 3B). Surprisingly, A_{dVac} MCM7⁺ were identified exclusively in stages I (60%) and II (40%) of the SEC (Fig. 3C and D). The proliferative results presented herein indicate that A_{dVac} is the smallest spermatogonial population and also the most quiescent one, suggesting that A_{dVac} may represent a functionally distinct A_{und} population.

Expression of UTF1 and mitotic activity of A_{dVac}

We identified the concomitant expression of the undifferentiated spermatogonial (UTF1) and proliferative

(MCM7) markers in A_{dVac} and Other Spg (Table 2). All A_{dVac} were UTF1⁺ and corresponded to 16% of all UTF1⁺ spermatogonia (Fig. 4A and B). A_{dVac} UTF1⁺ showed lower mitotic activity (14%) than the Other Spg UTF1⁺ (28%; $**P<0.05$; Fig. 4C). Also, A_{dVac} expressed higher fluorescence intensity of UTF1 ($P<0.05$) than the Other Spg UTF1⁺, when not proliferating (Fig. 4D and E). Indeed, when UTF1⁺ spermatogonia were proliferating (MCM7⁺), the nuclear fluorescence intensity of UTF1 diminished (Fig. 4E).

Expression of GFRA1 and mitotic activity of A_{dVac}

We also identified concomitant expression of the undifferentiated spermatogonial GFRA1 and proliferative activity (MCM7) markers in A_{dVac} and Other Spg (Table 2). A_{dVac} GFRA1⁺ corresponded to 11% of the total GFRA1⁺ spermatogonia (Fig. 5A and B). Strikingly, when only the A_{dVac} population was considered, 88% of them were GFRA1⁺ but a small subpopulation (12%) did not express GFRA1 and was exclusively quiescent (GFRA1⁻/MCM7⁻) (Fig. 5C and D). Moreover, while all A_{dVac} GFRA1⁻ were quiescent (MCM7⁻), A_{dVac} GFRA1⁺ showed a lower mitotic activity (19%) than the Other Spg GFRA1⁺ (41%; $**P<0.05$) (Fig. 5E), reinforcing the notion that A_{dVac} may be a more quiescent A_{und} spermatogonia.

Co-expression of UTF1 and GFRA1 and correlation with mitotic activity of A_{dVac}

Considering that all A_{dVac} were UTF1⁺ and that a small subpopulation of A_{dVac} was GFRA1⁻, we investigated their colocalization and proliferative activity (Fig. 6A) and compared to the Others Spg (Table 2). Most cells of the A_{dVac} population were UTF1⁺/GFRA1⁺ (85%), while a small subpopulation was exclusively UTF1⁺ (UTF1⁺/GFRA1⁻) and represented only 2% of the total UTF1/GFRA1 pool (Fig. 6B). The colocalization analysis showed, once again, that A_{dVac} UTF1⁻ were not present. Besides A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁺, there was another spermatogonial population that exclusively expressed UTF1 (Other Spg UTF1⁺/GFRA1⁻), which corresponded to 11% of total UTF1/GFRA1 pool (Fig. 6B). The A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻ subpopulation was not proliferating ($P<0.05$), being exclusively quiescent cells (Fig. 6C). Intriguingly, A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁺ subpopulation presented a proliferative index similar to that found for the Other Spg UTF1⁺/GFRA1⁻ and Other Spg UTF1⁺/GFRA1⁺ ($P>0.05$; Fig. 6C), suggesting that, when GFRA1 is expressed, A_{dVac} may become mitotically active (MCM7⁺). Fluorescence intensity to check for expression of UTF1 was higher in A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻ than in the Other Spg UTF1/GFRA1/MCM7 pool ($P<0.05$), but similar to the A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁺/MCM7⁻ ($P>0.05$; Fig. 6D). These findings show that the small A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻ subpopulation behaves as the most quiescent spermatogonia of the human testis.

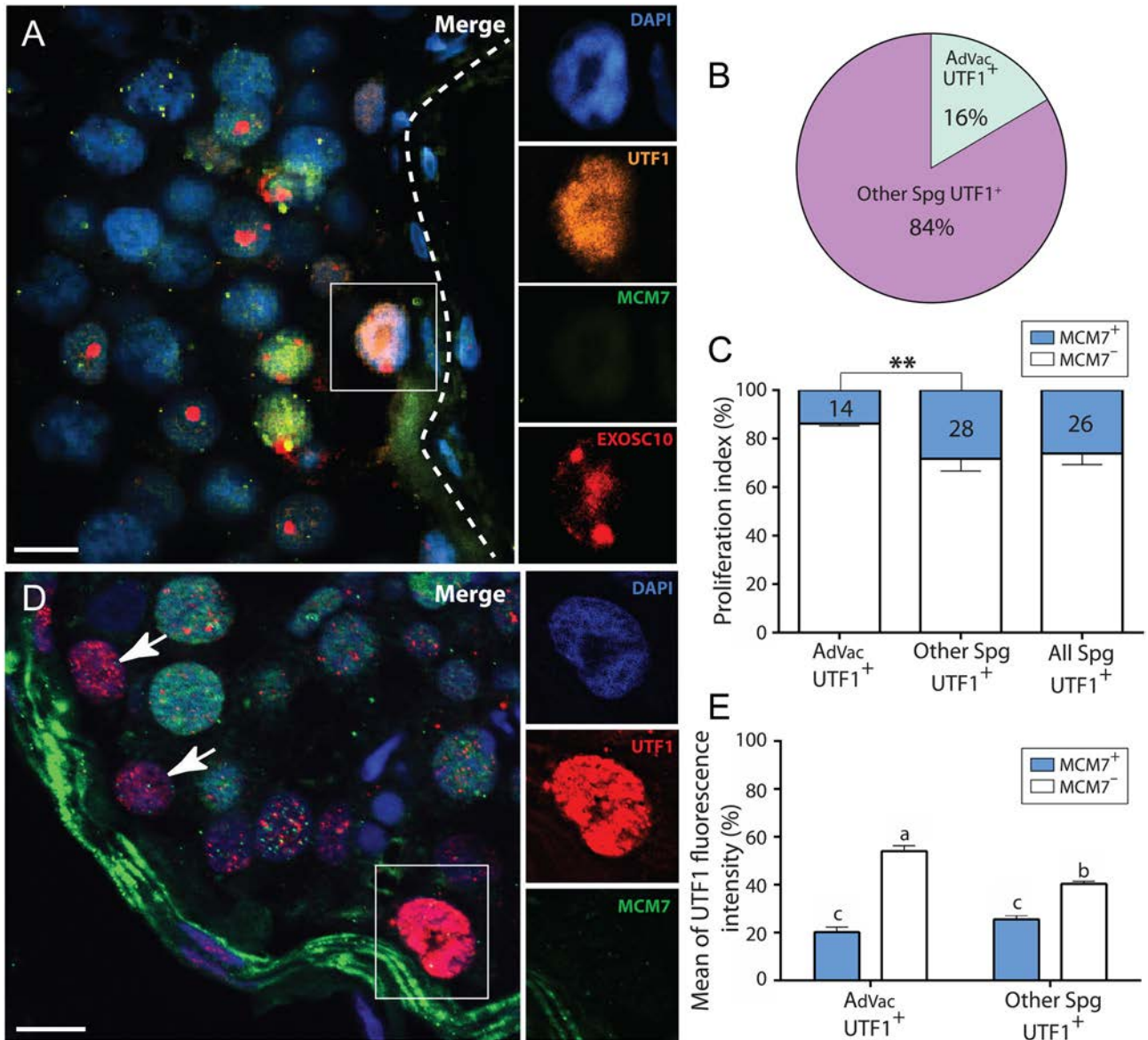


Figure 4 Characterization of human UTF1⁺ spermatogonia (n=5). (A) Photomicrographs showing the triple immunolocalization of UTF1, MCM7 and EXOSC10 in A_{dVac} spermatogonium (boxed and inserted). In the inserts, note the expression of UTF1 and the lack of MCM7. (B) Percentage of A_{dVac} and Others Spg in the UTF1⁺ spermatogonial population. (C) Proliferation index showing the lower mitotic activity of A_{dVac} UTF1⁺ compared to the Others Spg UTF1⁺ (**P<0.005). (D) Double immunolocalization of UTF1 and MCM7, showing higher expression of UTF1 by an A_{dVac} spermatogonium (boxed and in insert) than the two Others Spg UTF1⁺ (arrows). (E) Mean percentage of UTF1 fluorescence intensity estimated by the Image J software. Note that quiescent A_{dVac} spermatogonia (MCM7⁻) express the highest intensity of UTF1. Different letters (a–c) indicate statistical differences (P<0.05). Dashed line delimitates tunica propria. Scale Bars: 10 μm.

Co-expression of KIT with GFRA1 or UTF1 and correlation with mitotic activity

To verify if the differentiated spermatogonial marker KIT co-exists in A_{dVac} expressing GFRA1 or UTF1, a triple-immunolocalization was performed combining the search for KIT and MCM7 expression with the GFRA1 (Fig. 7A) and UTF1 (Fig. 7B). No A_{dVac} was observed expressing KIT in both analyses (Table 2). We found that 11% of Other Spg/PI GFRA1⁺ (Fig. 7C) and 11% of Other Spg/PI UTF1⁺ (Fig. 7D) expressed KIT (Table 2).

Also, KIT⁺ germ cells showed a high mitotic index (~66%) (Fig. 7E).

Human spermatogonial positioning in relation to blood vasculature

After identifying A_{dVac} as rarely dividing spermatogonia in the human testis, we investigated their positioning in the seminiferous tubules along the SEC (Fig. 8A and B) and correlated their proliferative activity to the blood

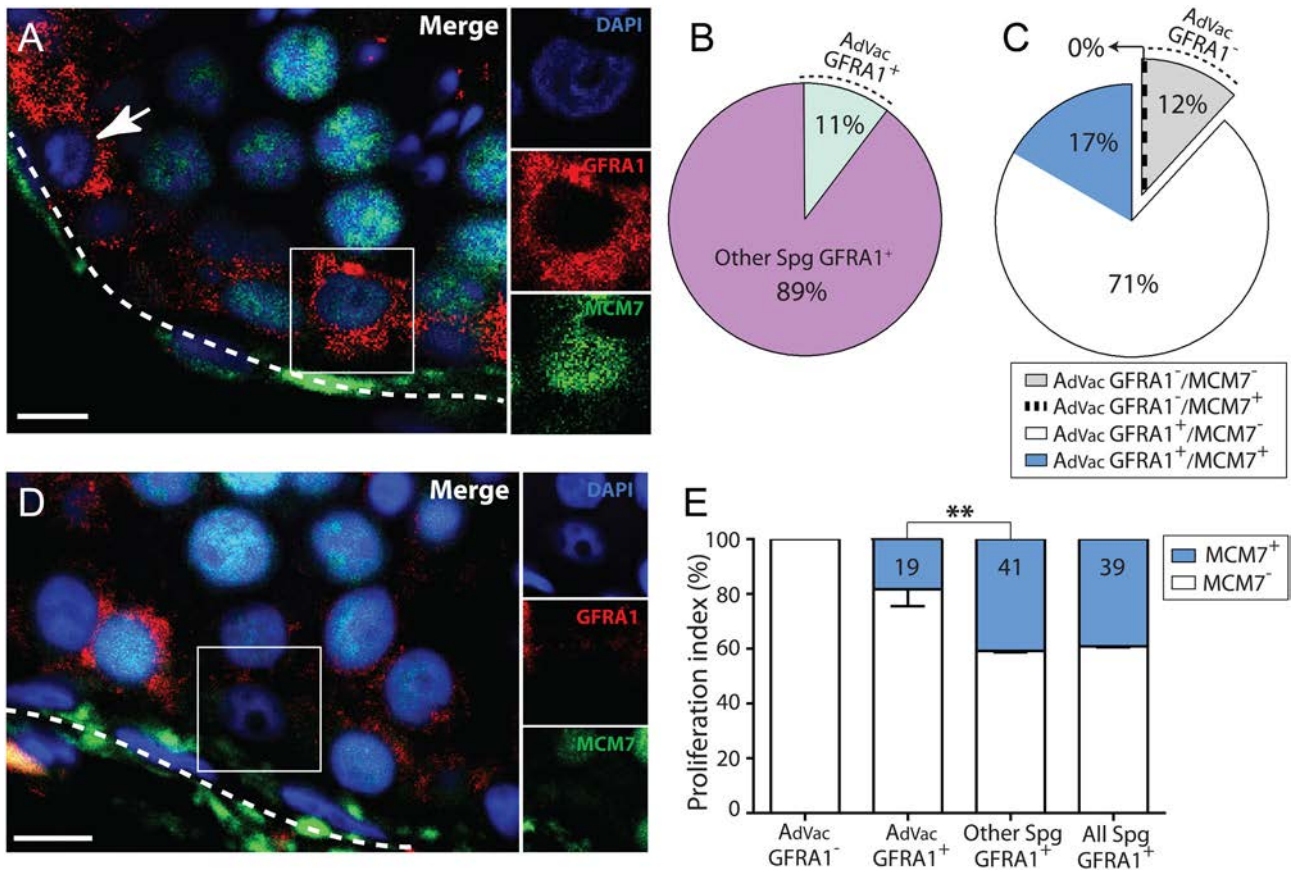


Figure 5 Characterization of human GFRA1⁺ spermatogonia ($n=5$). Double co-localization of GFRA1 and MCM7 in human spermatogonia, showing (A) the presence of A_{dVac} GFRA1⁺/MCM7⁺ (boxed and insert) and A_{dVac} GFRA1⁺/MCM7⁻ (arrow). (B) Percentage of A_{dVac} and Others Spg in the GFRA1⁺ spermatogonial population. (C) Percentage of GFRA1/MCM7 within the A_{dVac} population. Note that 12% of A_{dVac} did not express GFRA1 and were exclusively quiescent (MCM7⁻). (D) Double co-localization showing the presence of an A_{dVac} GFRA1⁻/MCM7⁻ (boxed and insert). (E) Proliferation index of A_{dVac} and the Others Spg GFRA1⁺ spermatogonia. Observe that A_{dVac} GFRA1⁺ have lower mitotic activity than the Others Spg GFRA1⁺ (**single vs statistical difference, $P<0.005$). Dashed line delimitates tunica propria. Scale Bars: 10 μ m.

vasculature (Fig. 8C). Under HRLM, A_{dVac} spermatogonia were positioned closest to the blood vessels (43–57 μ m) in comparison to the other spermatogonia and PI in most stages of the SEC ($*P<0.05$) (Fig. 8B). The positioning of A_{dNoVac} and A_{pale} spermatogonia were similar along the SEC. Interestingly, evaluating the mitotic activity of spermatogonia in relation to the vasculature revealed that quiescent A_{dVac} (MCM7⁻) were preferentially positioned close to the blood vessels ($*P<0.05$) (Fig. 8C). Thus, especially when quiescent, A_{dVac} position closer to the vasculature than the other spermatogonia.

Discussion

Recent studies demonstrated that the germ cells proposed as human SSCs, which have been morphologically recognized as A_{dark} or their subtypes (with and without nuclear rarefaction zone) and A_{pale} , all display a complex physiology with high levels of genomic heterogeneity (von Kopylow *et al.* 2012a,b, Di Persio *et al.* 2017, Jan *et al.* 2017, Guo *et al.* 2018, Hermann *et al.* 2018, Sohni

et al. 2019). This complexity hampered the identification of an exclusive stem cell population that would be the reserve and/or actively dividing SSCs. Herein, we show for the first time that A_{dVac} are the smallest population among human spermatogonia (10%), which express undifferentiated spermatogonial markers in a peculiar way, present the lowest proliferative activity (~11%) and are positioned nearby blood vessels when quiescent. In addition, we found that within A_{dVac} there was a small subpopulation expressing the highest levels of UTF1 while lacking GFRA1 and being exclusively quiescent, the A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻ (~2% of UTF1/GFRA1 pool). These findings suggest that this subpopulation is the human reserve SSC.

To evaluate the population distribution of human spermatogonia in the seminiferous epithelium, we used the six-stage germ cell association (Clermont 1963). The precise morphological identification of human germ cells and the six stages of SEC were possible due to a recent HRLM study of plastic-embedded tissues (Nihl *et al.* 2017). Under these conditions, established

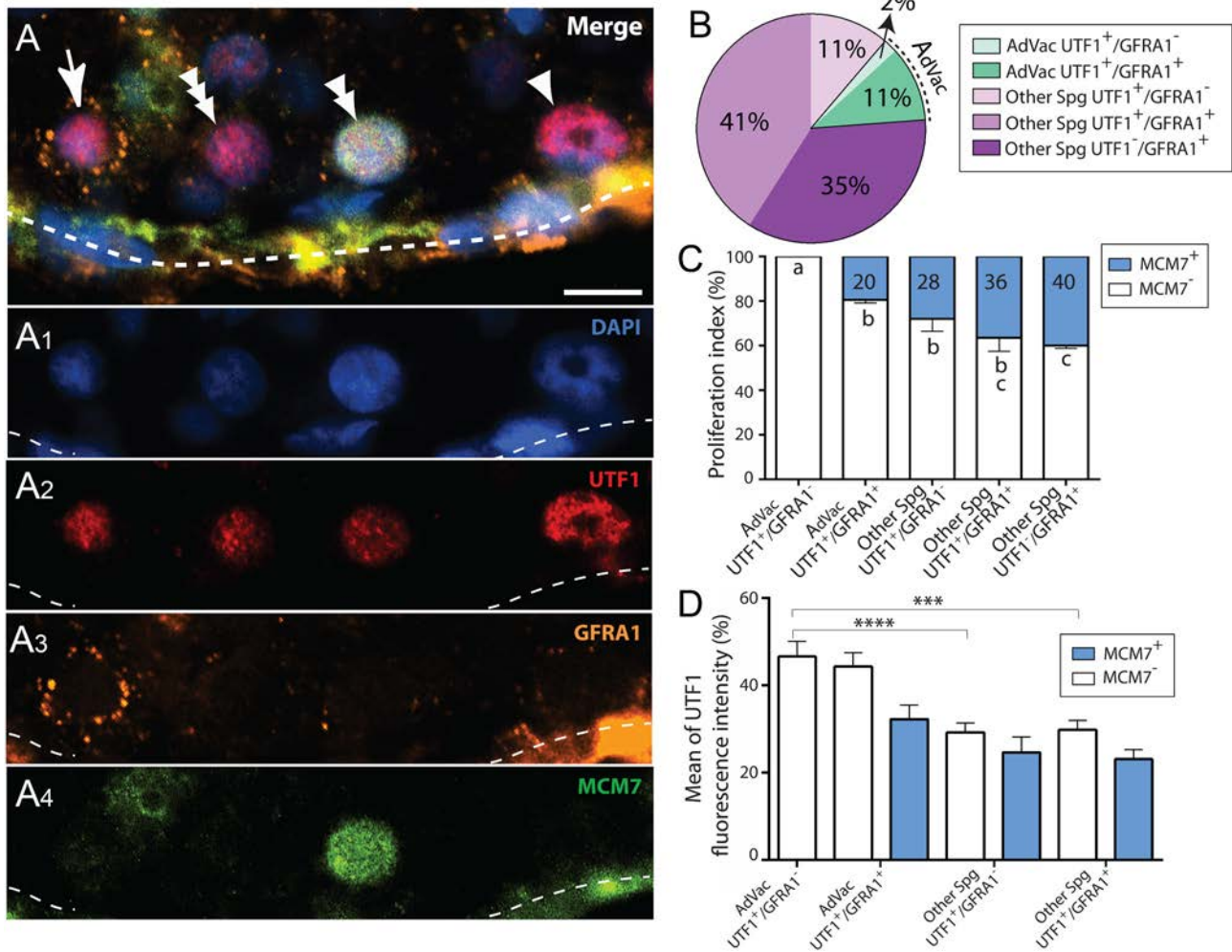


Figure 6 Co-localization of UTF1 and GFRA1 in human spermatogonia ($n=3$). (A) Triple co-localization of UTF1 (A₂), GFRA1 (A₃) and MCM7 (A₄), showing the presence of *A_{dVac}* UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻ (arrowhead), Others Spg UTF1⁺/GFRA1⁺/MCM7⁺ (double arrowhead), Other Spg UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻ (triple arrowhead) and Others Spg UTF1⁺/GFRA1⁺/MCM7⁻ (arrow). (B) Percentage of *A_{dVac}* and Others Spg in the UTF1/GFRA1 spermatogonial population. Within UTF1/GFRA1 population only 2% were *A_{dVac}* UTF1⁺/GFRA1⁻. (C) Proliferation index showing *A_{dVac}* UTF1⁺/GFRA1⁻ as the most quiescent spermatogonia ($P < 0.05$). (D) Mean of UTF1 fluorescence intensity (%) estimated by the Image J software. Quiescent *A_{dVac}* UTF1⁺/GFRA1⁻ expressed higher intensity of fluorescence than all the quiescent Others Spg ($***P < 0.001$; $****P < 0.0001$). Dashed line delimitates tunica propria. Scale Bar: 10 μ m.

as the baseline, it was possible to identify a numerical variation in the population of human spermatogonia throughout a segment of seminiferous epithelium over time, regardless of their developmental order and number of generations. Following this approach, we showed that the number of *A_{dVac}* was lower than other *A_{und}* spermatogonia and presented a small numerical variation over almost all stages of the SEC. Interestingly, when a reduction in *A_{dVac}* number was observed, at the same time there was an increase in the numbers of *A_{dNoVac}*/*A_{pale}* and the number of spermatogonial mitoses. This kinetic demonstrated that while *A_{dNoVac}* and *A_{pale}* showed similar population with the same increase and decrease waves along the SEC, *A_{dVac}* was found as a small population with a constant number of cells, which is consistent with previous studies reporting reserve

SSCs as being small and constant cohorts of cells under physiological conditions (Lock *et al.* 1982, Van Beek *et al.* 1984).

Although the numbers of *A_{dNoVac}* and *A_{pale}* differ in most stages of the SEC, they followed the same trend throughout the cycle. Their numbers began to increase exactly at the stages just after spermiation and when dividing B spermatogonia derive the preleptotene spermatocytes. Such behavior suggests that *A_{dNoVac}*/*A_{pale}* increase proliferation to supply the pool of B spermatogonia for the next spermatogenic cycle, as it was observed in rodents where *A_{und}* (*A_{aligned}*) spermatogonia increase their proliferative activity to supply the pool of differentiating (*A₁*) spermatogonia (Lock *et al.* 1982, reviewed in de Rooij 1998). Although the findings reported herein showed a similar pattern for

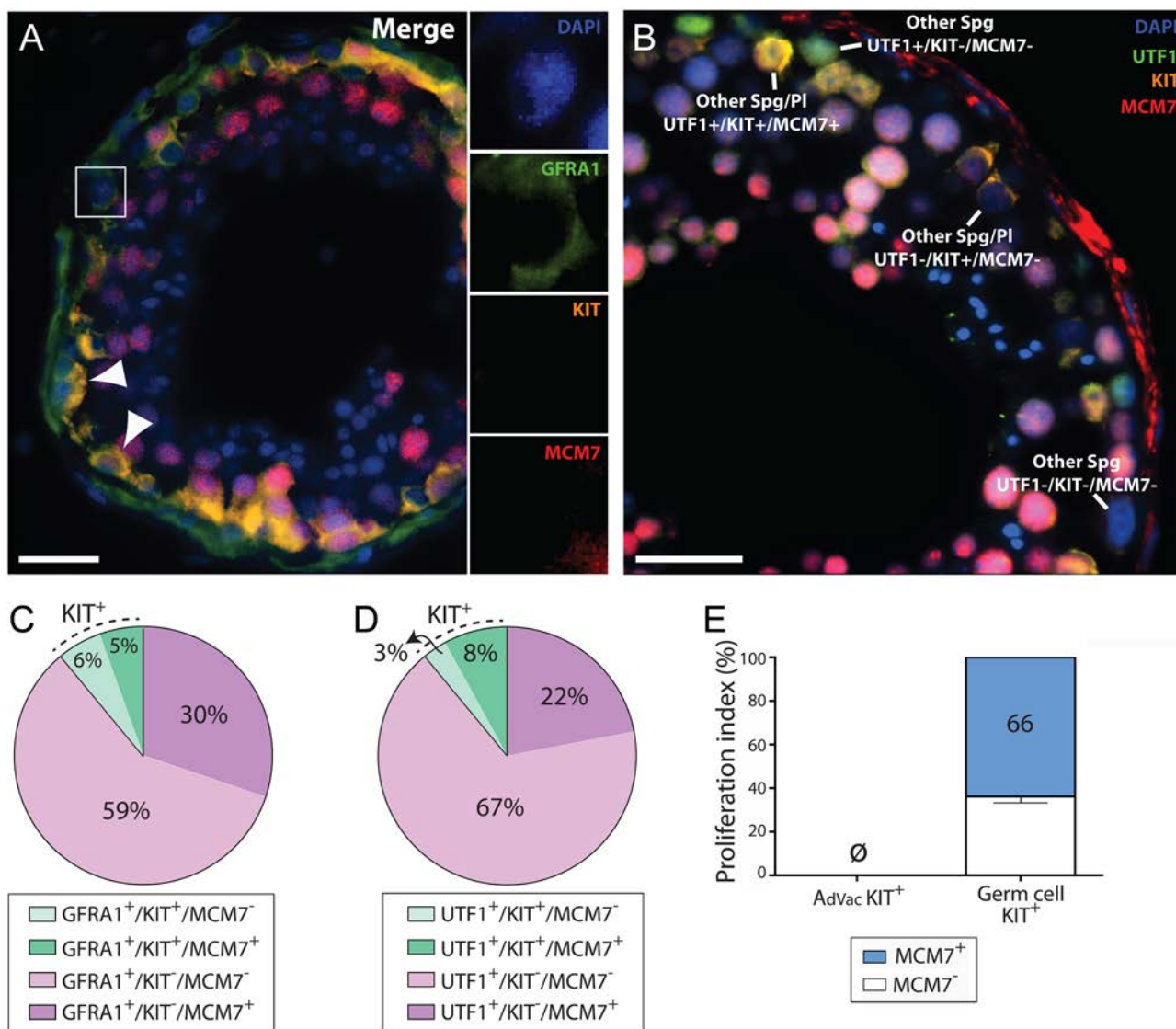


Figure 7 Co-localization of GFRA1 or UTF1 with KIT in human spermatogonia ($n=3$). (A) A_{dVac} does not express KIT (boxed and insert) whereas Others Spg/PI GFRA1⁺ was KIT⁺ (arrowhead). (B) Observe that some Others Spg/PI UTF1⁺ expressed KIT. Percentage of (C) Others Spg/PI GFRA1⁺/KIT⁺/MCM7⁻ and (D) Others Spg/PI UTF1⁺/KIT⁺/MCM7⁻ populations. (E) Proliferation index showing that A_{dVac} spermatogonia do not express KIT (\emptyset , not observed). Scale Bars: 25 μ m.

A_{dNoVac} and A_{pale} as actively dividing cells, the results do not determine their role in the human spermatogonial dynamic. Further research is needed to define whether they are distinct cell types, the same cell generation but at different stages of the cell cycle or even A_{und} in a transitional state, as proposed previously (Ehmcke *et al.* 2005, Ehmcke & Schlatt 2006).

Earlier studies using the KI67 proliferative marker indicated that A_{dark} (Di Persio *et al.* 2017), as well as its subtype A_{dVac} (von Kopylow *et al.* 2012a), are quiescent spermatogonia. However, the probability of finding an immunostained cell with a low mitotic index was small because KI67 is mainly present during the cell cycle phases G2 and M, which lasts only a couple of hours (Bruno & Darzynkiewicz 1992). Therefore, to enhance

the chance of finding a reserve SSC proliferating, we used a wide-spectrum proliferative marker MCM7, which is a critical component to trigger DNA replication, mainly found during the longest phases of the cell cycle G1 and S (Blow & Hodgson 2002, Com *et al.* 2006). MCM7 was described in rodent spermatogenesis (Com *et al.* 2006) and recently, using BrdU/MCM7 double-immunostaining, we found the marker in the non-human primate black-tufted marmoset spermatogonia (data not published). Only 11% of A_{dVac} were identified as dividing, which correspond to 0.5% (0.21 A_{dVac} MCM7⁺ in a total of 42 Spg-PI/mm) of the total spermatogonia/preleptotene in the basement membrane of seminiferous tubules. Indeed, A_{dVac} are rarely dividing cells, as reported previously with the proliferative

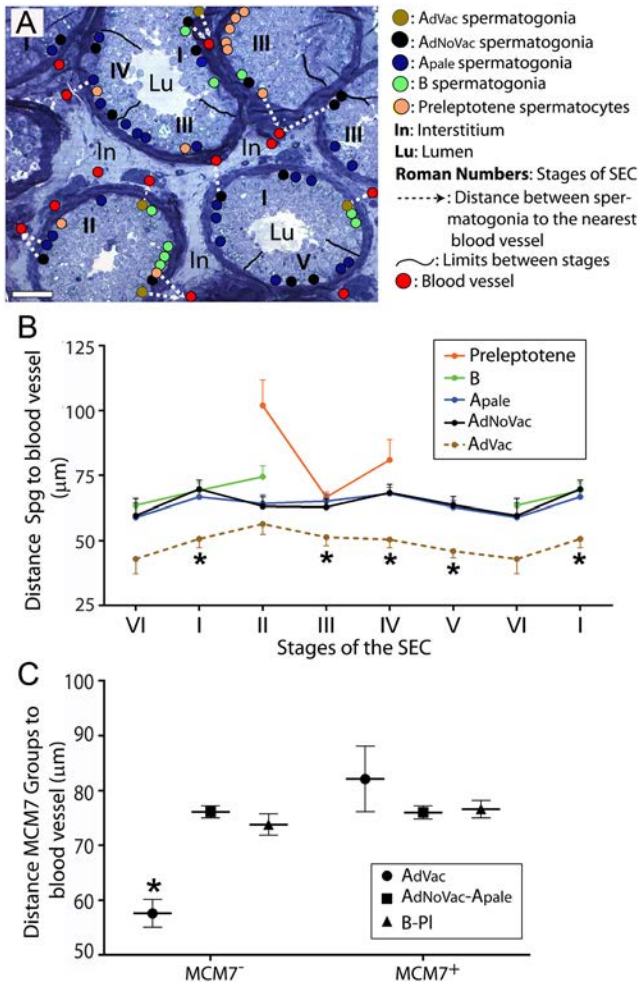


Figure 8 Human spermatogonia positioning in relation to the blood vasculature ($n=5$). (A) Illustration demonstrating the method used to measure the distance between spermatogonia and preleptotene spermatocytes to the blood vessels. Scale Bar: 60 μm . (B) Distance between each spermatogonial generation and preleptotene spermatocytes to the nearest blood vessel along the six stages of the SEC, evaluated under HRLM. A_{dVac} spermatogonia presented the shortest distance to blood vessels at stages I and III–V ($*P<0.05$, significant differences in longitudinal comparisons within the same stages). (C) Distance of MCM7⁺ and MCM7⁻ germ cells to the closest blood vessel, evaluated by IHC. Note that only quiescent A_{dVac} (MCM7⁻) were preferentially positioned nearby blood vessels ($*P<0.05$). Spg, spermatogonia.

marker PCNA (Pohl *et al.* 2019). Interestingly, we found that A_{dVac} MCM7⁺ were exclusively present in the stages I and II of the SEC, when the numbers of A_{dNoVac} and A_{pale} were diminishing. The mitosis of A_{dVac} observed at this time could be related to the replacement of A_{dNoVac} and/or A_{pale} because their numbers progressively increased afterward. Despite showing that human A_{und} spermatogonia have different kinetic, the present study does not clarify whether the A_{dVac} divisions in the stages I and II of the SEC are related to the self-renewal or the production of A_{dNoVac}/A_{pale} .

Since our morphometric and proliferative analyses suggested A_{dVac} as the reserve SSC, we proceeded to confirm its undifferentiated state by looking for the expression of specific spermatogonial markers while correlating it with the mitotic activity. We found that all A_{dVac} were UTF1⁺, as previously reported (von Kopylow *et al.* 2012a,b) and showed, for the first time, that A_{dVac} had the lowest proliferative index within the UTF1⁺ pool. Surprisingly, not all A_{dVac} expressed GFRA1, in contrast with previous studies (von Kopylow *et al.* 2012a, Jan *et al.* 2017), although this subtype showed the lowest commitment to mitosis within the GFRA1⁺ pool. Indeed, 12% of A_{dVac} did not express GFRA1 (A_{dVac} GFRA1⁻) and were exclusively quiescent (MCM7⁻), which attracted our attention. Colocalizing UTF1/GFRA1, we found a small A_{dVac} subpopulation, corresponding to ~2% of the UTF1/GFRA1 pool, that was exclusively quiescent ($0.68 \pm 0.04 A_{dVac}$ UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻ in $36.16 \pm 2.95 A_{und}$ UTF1/GFRA1, Table 2). Considering A_{und} spermatogonia without identifying the phenotype, a previous study revealed a UTF1⁺/GFRA1⁻ undifferentiated, exclusively quiescent population (Di Persio *et al.* 2017). However, in the present study, separating A_{dVac} from other A_{und} and using MCM7 as a proliferative marker, we were able to identify two subpopulations within UTF1⁺/GFRA1⁻ pool: (1.) A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻ that were exclusively quiescent and (2.) Other Spg UTF1⁺/GFRA1⁻ mitotically active. Taking into account that UTF1 is highly expressed in primitive undifferentiated spermatogonia (Guo *et al.* 2018, Sohni *et al.* 2019), we measured the fluorescence intensity of UTF1 and observed that it was higher in the quiescent A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻ than in the Other Spg UTF1⁺/GFRA1⁻. These findings strongly suggest that A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻ as the human reserve SSC.

Although GFRA1 was considered a conserved marker expressed by A_{dark} and A_{pale} (Hermann *et al.* 2009, Jan *et al.* 2017, reviewed in von Kopylow & Spiess 2017), recent studies reported that GFRA1 populations are less enriched in sorted SSCs (Guo *et al.* 2018, Hermann *et al.* 2018, Sohni *et al.* 2019). In agreement with these studies, we found that the rarely dividing undifferentiated spermatogonia (A_{dVac} UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻) do not express GFRA1. In addition, we observed that GFRA1 is related to an increase in spermatogonial mitotic activity as seen in the A_{dVac} and Others Spg subpopulations (Fig. 6C).

None of A_{dVac} UTF1/GFRA1 express the differentiated spermatogonial marker KIT, thus confirming their undifferentiated state, as previously reported (von Kopylow *et al.* 2012a,b). These results suggest that the transition between the undifferentiated to the differentiating spermatogonia may not occur directly through A_{dVac} spermatogonia. Although A_{dNoVac} and/or A_{pale} express the KIT marker, the present study does not clarify the dynamic of A_{und} spermatogonial population and how it is involved in type B spermatogonia production.

Here, we show for the first time in humans that A_{dVac} are closer to blood vessels than all the other spermatogonial types, as previously reported for the most undifferentiated spermatogonia of several mammal species (Chiarini-Garcia *et al.* 2001, 2003, Yoshida *et al.* 2007, Nascimento *et al.* 2009, Costa *et al.* 2012) including a non-human primate (Caldeira-Brant *et al.* 2018). A_{dVac} MCM7⁻ were preferentially positioned nearby the blood vasculature, while A_{dVac} MCM7⁺ were found at the same distance from the vasculature as the other spermatogonia and exclusively found at the stages I and II of the SEC. These results provide some evidence of the spermatogonial niche in human testis and suggest that factors coming from the vasculature may regulate A_{dVac} . Notwithstanding these findings, further molecular/functional evaluations are required to understand the meaning of the proliferating (MCM7⁺) and quiescent (MCM7⁻) positioning of A_{dVac} in relation to the stages I and II of the SEC and to the vascular network.

The morphofunctional data presented in this study is the first to suggest a different behavior for A_{und} spermatogonial phenotypes along the SEC, suggesting that a subpopulation of A_{dVac} highly expressing UTF1, lacking expression of GFRA1 and non-dividing (UTF1⁺/GFRA1⁻/MCM7⁻) is the most undifferentiated and quiescent human SSC. The findings reported herein may open possibilities for basic research and clinical applications for assisted reproduction to treat male diseases and infertility.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was partially supported by the following Brazilian organizations: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Author contribution statement

Tissue collection, data acquisition and analysis were performed by A L C-B, L M M, M M M, A B R and R M. All authors performed data interpretation. A L C-B, F R C L A and H C G performed manuscript drafting and critical revision. Research conception and design was performed by A L C-B and H C-G. Research supervision was performed by H C-G. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

We thank Dr Guilherme M Costa for the GFRA1 antibody (sc-6157) used in immunostaining assays and the Centro de

Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI (ICB/UFMG) for the use of its facilities.

References

- Abercrombie M 1946 Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical Record* **94** 239–247. (<https://doi.org/10.1002/ar.1090940210>)
- Amann RP & Almquist JO 1962 Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science* **45** 774–781. ([https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89487-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89487-9))
- Blow JJ & Hodgson B 2002 Replication licensing – origin licensing defining the proliferative state? *Trends in Cell Biology* **12** 72–78. ([https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02203-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02203-6))
- Bruno S & Darzynkiewicz Z 1992 1992 cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Proliferation* **25** 31–40. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1992.tb01435.x>)
- Caldeira-Brant AL, Eras-Garcia L, Alves-Freitas D, Almeida FRCL & Chiarini-Garcia H 2018 Spermatogonial behavior in marmoset: a new generation, their kinetics and niche. *Molecular Human Reproduction* **24** 299–309. (<https://doi.org/10.1093/molehr/gay017>)
- Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD & Russell LD 2001 Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biology of Reproduction* **65** 1179–1185. (<https://doi.org/10.1095/biolreprod65.4.1179>)
- Chiarini-Garcia H, Raymer AM & Russell LD 2003 Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* **126** 669–680. (<https://doi.org/10.1530/rep.0.1260669>)
- Chiarini-Garcia H, Lima MYS, Reis AB, Martello R, Nihi F, Gomes MLM & Almeida FRCL 2017 Influence of three different histological methods on the morphology and morphometrical data in human testis. *Histology and Histopathology* **32** 27–34. (<https://doi.org/10.14670/HH-11-765>)
- Clermont Y 1963 The cycle of seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy* **112** 35–51. (<https://doi.org/10.1002/aja.1001120103>)
- Clermont Y 1966a Renewal of spermatogenesis in man. *American Journal of Anatomy* **118** 509–524. (<https://doi.org/10.1002/aja.1001180211>)
- Clermont Y 1966b Spermatogenesis in man: a study of the spermatogonial population. *Fertility and Sterility* **17** 705–721. ([https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)36120-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)36120-9))
- Com E, Rolland AD, Guerroi M, Aubry F, Jégou B, Vallet-Erdtmann V & Pineau C 2006 Identification, molecular cloning, and cellular distribution of the rat homolog of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) in the rat testis. *Molecular Reproduction and Development* **73** 866–877. (<https://doi.org/10.1002/mrd.20453>)
- Costa GM, Avelar GF, Rezende-Neto JV, Campos-Junior PH, Lacerda SM, Andrade BS, Thomé RG, Hofmann MC & Franca LR 2012 Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PLoS ONE* **7** e44091. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044091>)
- de Rooij DG 1998 Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology* **79** 67–80. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1998.00057.x>)
- Di Persio S, Saracino R, Fera S, Muciaccia B, Esposito V, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Stefanini M *et al.* 2017 Spermatogonial kinetics in humans. *Development* **144** 3430–3439. (<https://doi.org/10.1242/dev.150284>)
- Ehmcke J & Schlatt S 2006 A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction* **132** 673–680. (<https://doi.org/10.1530/rep.1.01081>)
- Ehmcke J, Simorangkir DR & Schlatt S 2005 Identification of the starting point for spermatogenesis and characterization of the testicular stem cell in adult male rhesus monkeys. *Human Reproduction* **20** 1185–1193. (<https://doi.org/10.1093/humrep/deh766>)
- Fayomi AP & Orwig KE 2018 Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research* **29** 207–214. (<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>)
- Fouquet JP & Dadoune JP 1986 Renewal of spermatogonia in the monkey (*Macaca Fascicularis*). *Biology of Reproduction* **35** 199–207. (<https://doi.org/10.1095/biolreprod35.1.199>)

- Guo J, Grow EJ, Micochova H, Maher GJ, Lindskog C, Nie X, Guo Y, Takei Y, Yun J, Cai L *et al.* 2018 The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Research* **28** 1141–1157. (<https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>)
- Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM & Orwig KE 2009 Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Human Reproduction* **24** 1704–1716. (<https://doi.org/10.1093/humrep/dep073>)
- Hermann BP, Cheng K, Singh A, Roa-De La Cruz L, Mutoji KN, Chen IC, Gildersleeve H, Lehle JD, Mayo M, Westernströer B *et al.* 2018 The mammalian spermatogenesis single-cell transcriptome, from spermatogonial stem cells to spermatids. *Cell Reports* **25** 1650.e8–1667.e8. (<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.026>)
- Jan SZ, Vormer TL, Jongejan A, Röling MD, Silber SJ, de Rooij DG, Hamer G, Repping S & van Pelt AMM 2017 Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Development* **144** 3659–3673. (<https://doi.org/10.1242/dev.152413>)
- Lok D, Weenk D & de Rooij DG 1982 Morphology, proliferation, and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster and the ram. *Anatomical Record* **203** 83–99. (<https://doi.org/10.1002/ar.1092030109>)
- Nascimento HF, Drumond AL, de França LR & Chiarini-Garcia H 2009 Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *International Journal of Andrology* **32** 486–497. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00884.x>)
- Neuhaus N, Yoon J, Terwort N, Kliesch S, Seggewiss J, Hüge A, Voss R, Schlatt S, Grindberg RV & Scholer HR 2017 Single-cell gene expression analysis reveals diversity among human spermatogonia. *Molecular Human Reproduction* **23** 79–90. (<https://doi.org/10.1093/molehr/gaw079>)
- Nihi F, Gomes MLM, Carvalho FAR, Reis AB, Martello R, Melo RCN, Almeida FRCL & Chiarini-Garcia H 2017 Revisiting the human seminiferous epithelium cycle. *Human Reproduction* **32** 1170–1182. (<https://doi.org/10.1093/humrep/dex064>)
- Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodriguez MC & Alonso JR 1986 Quantitative differences between variants of A spermatogonia in man. *Journal of Reproduction and Fertility* **77** 669–673. (<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770669>)
- Pohl E, Höffken V, Schlatt S, Kliesch S, Gromoll J & Wistuba J 2019 Ageing in men with normal spermatogenesis alters spermatogonial dynamics and nuclear morphology in Sertoli cells. *Andrology* **7** 827–839. (<https://doi.org/10.1111/andr.12665>)
- Sharma S, Wistuba J, Pock T, Schlatt S & Neuhaus N 2019 Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance. *Human Reproduction Update* **25** 275–297. (<https://doi.org/10.1093/humupd/dmz006>)
- Sohni A, Tan K, Song HW, Burow D, de Rooij DG, Laurent L, Hsieh TC, Rabah R, Hammoud SS, Vicini EE *et al.* 2019 The neonatal and adult human testis defined at the single-cell level. *Cell Reports* **26** 1501.e4–1517.e4. (<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.045>)
- van Alphen MM, van de Kant HJ & de Rooij DG 1988 Repopulation of the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation. *Radiation Research* **113** 487–500. (<https://doi.org/10.2307/3577245>)
- van Beek ME, Davids JA, van de Kant HJ & de Rooij DG 1984 Response to fission neutron irradiation of spermatogonial stem cells in different stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Radiation Research* **97** 556–569. (<https://doi.org/10.2307/3576147>)
- von Kopylow K & Spiess AN 2017 Human spermatogonial markers. *Stem Cell Research* **25** 300–309. (<https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.11.011>)
- von Kopylow K, Staeger H, Spiess A, Schulze W, Will H, Primig M & Kirchhoff C 2012a Differential marker protein expression specifies rarefaction zone-containing human A dark spermatogonia. *Reproduction* **143** 45–57. (<https://doi.org/10.1530/REP-11-0290>)
- von Kopylow K, Staeger H, Schulze W, Will H & Kirchhoff C 2012b Fibroblast growth factor receptor 3 is highly expressed in rarely dividing human type A spermatogonia. *Histochemistry and Cell Biology* **138** 759–772. (<https://doi.org/10.1007/s00418-012-0991-7>)
- Wistuba J, Schrod A, Greve B, Hodges JK, Aslam H, Weinbauer GF & Luetjens CM 2003 Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biology of Reproduction* **69** 582–591. (<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015925>)
- Yoshida S, Sukeno M & Nabeshima Y 2007 A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* **317** 1722–1726. (<https://doi.org/10.1126/science.1144885>)

Received 8 June 2019

First decision 1 July 2019

Revised manuscript received 22 January 2020

Accepted 28 January 2020