

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA PERDA DE CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS  
E DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DAS  
ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO, EM CAMUNDONGOS  
EXPOSTOS A DIFERENTES REGIMES DE TRATAMENTO  
COM A CICLOFOSFAMIDA**

Belo Horizonte

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

AVALIAÇÃO DA PERDA DE CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS  
E DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DAS  
ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO, EM CAMUNDONGOS  
EXPOSTOS A DIFERENTES REGIMES DE TRATAMENTO  
COM A CICLOFOSFAMIDA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução  
Departamento de Morfologia  
ICB/UFMG

**Doutoranda:** Ana Luiza Drumond

**Orientador:** Dr. Hélio Chiarini-Garcia

**Colaborador:** Dr. Marvin L. Meistrich

Belo Horizonte  
2011

ANA LUIZA DRUMOND

AVALIAÇÃO DA PERDA DE CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS  
E DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DAS  
ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO, EM CAMUNDONGOS  
EXPOSTOS A DIFERENTES REGIMES DE TRATAMENTO  
COM A CICLOFOSFAMIDA

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2011

Drumond, Ana Luiza Alvarenga

Avaliação da perda de células espermatogênicas e da capacidade de colonização das espermatogônias-tronco, em camundongos expostos a diferentes regimes de tratamento com a ciclofosfamida. [manuscrito] / Ana Luiza Alvarenga Drumond. – 2011.

115 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Hélio Chiarini-Garcia.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Testículos – Teses. 2. Biologia celular – Teses. 3. Ciclofosfamida. 4. Células tronco espermatogoniais. I. Chiarini-Garcia, Helio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.3: 615.7



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

**ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO**  
**ANA LUÍZA DRUMOND**

90/2011/02  
entrada  
1º/2007  
2007662056

Às quatorze horas do dia 30 de maio de 2011 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: "Avaliação da perda de células espermatozóides e da capacidade de colonização das espermatogônias-tronco, em camundongos expostos a diferentes regimes de tratamento com a ciclofosfamida", requisito final para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **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 à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Hélio Chiarini-Garcia	UFMG	Aprovada
Dr. Sebastião Roberto Taboga	UNESP	Aprovada
Dra. Irina Kerkis	BUTANTAN	aprovada
Dra. Cleida Aparecida de Oliveira	UFMG	Aprovada
Dr. Elizette Rizo	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata, 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, 30 de maio de 2011.**

Dr. Hélio Chiarini-Garcia \_\_\_\_\_  
(Orientador)

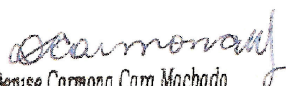
Dr. Sebastião Roberto Taboga \_\_\_\_\_

Dra. Irina Kerkis \_\_\_\_\_

Dra. Cleida Aparecida de Oliveira \_\_\_\_\_

Dra. Elizete Rizzo \_\_\_\_\_

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

  
Prof. Denise Carmona Cara Machado  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular, ICB/UFMG

Dedico esse trabalho aos meus tão bravos amigos,  
que deixam o nosso país para se aventurar em terras estrangeiras,  
e que, à procura de um crescimento profissional e/ou pessoal,  
trabalham duro, enfrentam as diferenças e as saudades,  
na busca incessante de se tornar uma pessoa melhor.

## AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

- Ao professor Hélio, pela orientação, pela amizade, pelo carinho, pelos puxões de orelha e por tantos momentos compartilhados nesses longos sete anos;
- Thank you Dr. Marvin Meistrich, for having me at your lab, and for contributing in so many ways to my professional and personal growth;
- Às professoras Fernanda e Gleydes;
- À Maria Luiza, técnica do Laber;
- Aos colegas do Laber, tantos alunos que por lá passaram nesses quatro anos, e àqueles que por lá ainda estão: Aline, Amanda, Ana Luisa, Carolina, Daniel, Débora, Felipe, Francisco, Gisele, Letícia, Letícia, Marilda, Michele, Nadine, Paula, Renata, Tatiane. Vocês também fazem parte do meu crescimento;
- Thanks to all the crew from Dr. Meistrich's lab, and to all the technicians and secretaries in the Department of Experimental Radiation Oncology, who work hard, but always with a big smile, and are "making cancer history";
- Aos colegas do Programa de Biologia Celular, muitos dos quais já terminaram sua saga por aqui e já se foram. Não há lugar para encontrar bons amigos e madrinhas de casamento como nesse Programa;
- À Sibebe, obrigada pela sua dedicação a todos nós, alunos e professores;
- Às funcionárias do Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do ICB/UFMG;
- Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular;
- Aos demais funcionários do Departamento de Morfologia;
- Aos meus pais, meus irmãos, e a toda a minha família, vocês suportaram e suportam a saudade, mas ficam todos sempre na torcida, não importa a distância. Vocês são uma parte indispensável de mim, não importa aonde eu vá;
- Aos meus queridos ex-houstonianos (outros nem tão ex assim), Tininha, Cris, Flavinha, Tiago, Rodrigo, Vini, William, Miguel, Raquel e Leandro, vocês foram amigos e família. Em uma "festa estranha, com gente esquisita", me fizeram sentir como em casa, em Terra Brasillis. Os momentos vividos por um ano vão ficar guardados pra sempre;
- Last, but definitely not least, thanks to my husband Mike, for his support, love, and care. For showing so much interest in Cellular Biology, Biology of Reproduction, and so many things you had no clue what they were about, most of the time. Thanks for being my partner in this crazy deal, which is grad school, always by my side, no matter how far.  
Or should I thank to my doctorate for bringing me to you?  
I guess I should thank you both...

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber) do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia;

Todos os experimentos aqui apresentados foram desenvolvidos no Departamento de Radiologia Oncológica Experimental, do UT MD Anderson Cancer Center - EUA, com a colaboração do Prof. Dr. Marvin L. Meistrich, e com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- National Institute of Health (NIH) – EUA



“A mente que se abre a uma nova idéia,  
jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

## SUMÁRIO

Resumo.....	1
1. INTRODUÇÃO	
1.1. A origem das células germinativas.....	2
1.2. Processo de auto-renovação e diferenciação a partir das espermatogônias-tronco.....	2
1.3. Fatores que regulam as espermatogônias.....	4
1.4. Estádios do ciclo do epitélio seminífero.....	6
1.5. O uso da ciclofosfamida e seus efeitos colaterais na reprodução masculina.....	7
1.6. Transplante de células germinativas.....	9
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1. Animais.....	15
• <i>Camundongos doadores</i> .....	15
• <i>Camundongos receptores</i> .....	17
3.2. Tratamentos com a ciclofosfamida.....	18
• <i>Tratamento com dose única</i> .....	18
• <i>Tratamento com múltiplas doses, aplicadas a cada 5 dias</i> .....	19
• <i>Tratamento com múltiplas doses, aplicadas a cada 4 dias</i> .....	20
3.3. Transplante de células germinativas.....	21
• <i>Obtenção da suspensão celular</i> .....	21
• <i>Injeção da suspensão celular</i> .....	22
3.4. Coleta e fixação dos testículos.....	22
3.5. Processamento histológico dos testículos.....	24
3.6. Contagem de espermatozoides testiculares.....	25
3.7. TUNEL e imunistoquímica.....	26
3.8. Análises morfológicas e morfométricas.....	27
• <i>Análise qualitativa</i> .....	27
• <i>Análise semi-quantitativa</i> .....	27
• <i>Número relativo de células germinativas por 100 nucléolos de células de Sertoli</i> .....	27
• <i>Apoptoses espermatogoniais</i> .....	28
• <i>Número de colônias produzidas após o transplante</i> .....	28
3.9. Análise estatística.....	29

4.	RESULTADOS .....	30
4.1.	Alterações causadas por uma única dose de ciclofosfamida.....	30
	• <i>Avaliação dos pesos corporais e testiculares.....</i>	30
	• <i>Indução de apoptose e depleção das células germinativas,.....</i>	31
	• <i>Avaliações realizadas aos 28 dias após o tratamento.....</i>	33
4.2.	Alterações causadas múltiplas doses de ciclofosfamida.....	35
	• <i>Alterações no peso corporal durante e após o tratamento.....</i>	35
	• <i>Quantificação de morte celular.....</i>	36
	• <i>Análises histológicas e de número celular.....</i>	37
4.3.	Recuperação do epitélio seminífero ao fim do tratamento.....	40
	• <i>Análises histológicas.....</i>	40
	• <i>Análise da recuperação da função testicular.....</i>	40
4.4.	Capacidade funcional das espermatogônias-tronco após transplante.....	41
	• <i>Número de células germinativas presente nos animais doadores.....</i>	41
	• <i>Características das suspensões celulares.....</i>	43
	• <i>Análises morfométricas dos camundongos receptores, após o transplante.....</i>	43
5.	DISCUSSÃO.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
	ANEXO I - TRABALHO PUBLICADO.....	62
	ANEXO II - TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	75

## Resumo

A espermatogênese é extremamente sensível a tratamentos quimioterápicos. A ciclofosfamida é um exemplo de droga amplamente utilizada em pacientes, que pode causar infertilidade nos homens. Baseando-nos no fato de que a ciclofosfamida diminui a contagem de espermatozoides, e de que a recuperação da produção espermática é dependente da regeneração das células-tronco, no presente estudo nós desenvolvemos um regime de tratamento com ciclofosfamida capaz de eliminar células germinativas em diferenciação nos testículos de camundongos, e avaliamos a habilidade das espermatogônias-tronco de regenerarem a espermatogênese *in situ* e após transplante de células germinativas. Nós utilizamos um tratamento com sete doses de ciclofosfamida, administradas com um intervalo de 4 dias entre doses, que resultou em uma drástica redução do número de células germinativas em diferenciação, porém aproximadamente 50% das espermatogônias do tipo A indiferenciadas ainda estavam presentes no epitélio seminífero, com morfologia normal. Nós monitoramos a cinética da recuperação espermática e encontramos que o número de espermatozoides testiculares foi restaurado para 64% do resultado apresentado para animais controle, dentro do tempo necessário para que as células-tronco se tornem espermatozoides. Quando as espermatogônias que sobreviveram ao tratamento com ciclofosfamida foram transplantadas para camundongos com espermatogênese endógena deprimida por radiação fracionada, a recuperação da espermatogênese foi reduzida para 12% do valor esperado, quando comparados com animais criptorquídicos. Assim, nós concluímos que múltiplas doses de ciclofosfamida não eliminaram completamente as espermatogônias-tronco, mas resultaram em perda celular e dano funcional das células-tronco.

# 1. Introdução

## 1.1. A origem das células germinativas

As células germinativas primordiais (CGPs) são células embrionárias extra-gonadais que dão origem às células germinativas dos machos e fêmeas, respectivamente espermatogônias e oogônias. As CGPs se originam a partir de uma pequena população de células do epiblasto (Lawson & Pedersen, 1992) que, em camundongos, migram da base do alantóide, através do intestino primitivo, até alcançarem as chamadas cristas urogenitais, entre os dias 9-11 pós-coito, onde terá início a formação dos testículos.

Ao chegarem às cristas genitais, as CGPs são envolvidas pelas células de Sertoli, e pelas células precursoras das células mióides, formando os cordões seminíferos. Após a formação dos cordões, as células germinativas passam a ser denominadas gonócitos (Huckins & Clermont, 1968; Revisão em Donovan & de Miguel, 2005). Estas células sofrem então divisões mitóticas por alguns dias, até se estacionarem na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular, estado em que permanecem até o momento do nascimento, em camundongos (Huckins & Clermont, 1968). Logo após o nascimento, os gonócitos voltam a proliferar e dão origem às espermatogônias-tronco (Vergouwen et al., 1991), e é a partir de divisões destas células que se inicia a espermatogênese, processo que vai resultar na formação dos espermatozoides.

## 1.2. Processo de auto-renovação e diferenciação a partir das espermatogônias-tronco

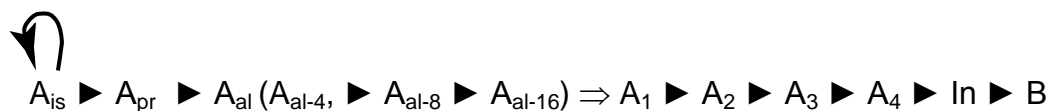
Em machos adultos, a célula mais primitiva no processo espermatogênico é a espermatogônia-tronco. Nos camundongos, esta célula é também conhecida como espermatogônia  $A_{\text{isolada}}$  ( $A_{\text{is}}$ ), uma vez que, através do estudo de túbulos seminíferos em montagem *in-toto*, ela pode ser observada sem quaisquer conexões citoplasmáticas com outras espermatogônias (de Rooij, 1998). As espermatogônias  $A_{\text{is}}$  apresentam características de uma célula-tronco clássica, isto é, ao se dividirem

podem formar células semelhantes a elas mesmas, através do processo de auto-renovação, ou originar células mais diferenciadas, neste caso, comprometidas com a espermatogênese.

No processo de diferenciação, a mitose das espermatogônias  $A_{is}$  resulta na formação das espermatogônias  $A_{pareadas}$  ( $A_{pr}$ ). Um indicador morfológico de que as gerações espermatogoniais subseqüentes estão comprometidas com a diferenciação é a ligação entre as células filhas da espermatogônia  $A_{is}$ , através das chamadas pontes inter-citoplasmáticas (Weber & Russell, 1987). Por sua vez, a divisão das espermatogônias  $A_{pr}$  leva à formação de cadeias de 4, 8 e 16 células denominadas de espermatogônias  $A_{alinhadas}$  ( $A_{al}$ ). Estes tipos espermatogoniais, de  $A_{is}$  até  $A_{al}$ , são também conhecidos como espermatogônias do tipo A indiferenciadas ( $A_{ind}$ ), ou imaturas, por possuírem graus variáveis de indiferenciação, e ainda não podem ser distinguidos uns dos outros através de marcadores morfológicos (Chiarini-Garcia & Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003) ou moleculares (Aponte et al., 2005).

Após a formação das espermatogônias  $A_{al}$ , as sucessivas divisões mitóticas geram os tipos celulares denominados espermatogônias do tipo A em diferenciação ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ , e  $A_4$ ), espermatogônias intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B (B). Atualmente estas células mais diferenciadas (de  $A_1$  até B) podem ser identificadas morfológicamente através das microscopias de luz de alta resolução (Chiarini-Garcia & Russell, 2001) e eletrônica de transmissão (Chiarini-Garcia & Russell, 2002). As espermatogônias do tipo B, as últimas células da linhagem espermatogonial, se dividem gerando espermatócitos primários, que iniciam a fase meiótica da espermatogênese.

O esquema a seguir (Figura 1) ilustra a possível constituição de diferentes clones de espermatogônias no camundongo desde a espermatogônia  $A_{is}$  até a última geração de espermatogônia, do tipo B (de Rooij & Russell, 2000; de Rooij, 2001).



**Figura 1** – Divisões mitóticas (cabeças de seta) de cada um dos diferentes tipos espermatogoniais em camundongos. São aproximadamente 9 divisões que vão formar, a partir de uma  $A_{is}$ , em torno de 1024 espermatogônias do tipo B. As espermatogônias  $A_{is}$  são as células-tronco do processo espermatogênico, tendo a capacidade de se auto-renovarem (seta curva). Entre as espermatogônias  $A_{al}$  e  $A_1$  (seta clara) não ocorre divisão mas sim diferenciação celular.

### 1.3. Fatores que regulam as espermatogônias

Quando se fala em fatores que regulam as espermatogônias, é importante lembrar que o grupo de espermatogônias A indiferenciadas é constituído pelas espermatogônias  $A_{is}$ ,  $A_{pr}$  e  $A_{al}$ , e que dentre elas apenas a  $A_{is}$  é considerada como espermatogônia-tronco e, ainda, que os marcadores descobertos até o momento não marcam especificamente a  $A_{is}$ , mas sim a todas as espermatogônias indiferenciadas, indistintamente.

Embora não tenham sido identificados marcadores específicos para as espermatogônias-tronco, vários fatores têm sido citados por exercerem um importante controle da regulação entre a auto-renovação e a diferenciação das células-tronco em mamíferos. Exemplos de fatores que, conhecidamente, regulam as espermatogônias indiferenciadas podem ser o GDNF (*glial cell-line derived neurotrophic factor*; Creemers et al., 2002; Naughton et al., 2006; Yomogida et al., 2003), o GFR $\alpha$ -1 (*GDNF family receptor alpha 1*; Buageaw et al., 2005;), o Plzf (*promyelocytic leukemia zinc-finger*; Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004;), o Ngn3 (Neurogenina 3; Yoshida et al., 2004) e o Sox3 (*SRY related high mobility group-box*; Raverot et al., 2005).

Dentre os vários fatores descritos por serem expressos nas células espermatogoniais está o receptor c-kit, que se liga ao fator de célula-tronco (SCF, *stem cell factor*), produzido pelas células de Sertoli. A importância desse marcador foi identificada em duas mutações, nos *locus WW White spotting* e *Sl steel*, que em camundongos resultam em esterilidade (Yoshinaga et al., 1991; Ohta et al., 2000). Durante a fase inicial do desenvolvimento fetal, o receptor para SCF é expresso pelas CGPs, sendo importante no sucesso da migração destas células para as gônadas. No entanto, após a formação do testículo, o receptor c-kit passa a ser expresso nas espermatogônias do tipo A em fase de diferenciação. Desta forma, as células de Sertoli regulam a proliferação das espermatogônias em diferenciação através do receptor c-kit (Yoshinaga et al., 1991; Ohta et al., 2000).

Além do sistema c-kit/SCF, o GDNF é também importante para a proliferação e diferenciação das células germinativas (Meng et al., 2000). Este fator é expresso pelas células de Sertoli, e se liga nas espermatogônias-tronco através dos receptores c-ret e GFR- $\alpha$ 1. Camundongos com a expressão de GDNF elevada apresentam um aumento do número de espermatogônias indiferenciadas, eventualmente, desenvolvendo tumores testiculares semelhantes ao seminoma observado em homens (Meng et al., 2000). Estudos recentes, utilizando diversas abordagens, indicam que o GDNF

estimula a proliferação das espermatogônias-tronco sem causar a diferenciação das mesmas (Kubota et al., 2004; Bugeaw et al., 2005; Hofmann et al., 2005; Kanatsu-Shinohara et al., 2005).

Outro marcador importante para as espermatogônias é o receptor ALK3 (alctivin receptor like kinase 3), presente em espermatogônias do tipo A, que se liga à proteína morfogênica do osso do tipo 4 (BMP4, *bone morphogenetic protein*) produzida pela célula de Sertoli. Experimentos *in vitro* revelaram que a BMP4 proporciona aumento na proliferação e diferenciação das espermatogônias. Tummers & Thesleff (2003) mostraram que a BMP4 também está envolvida no recrutamento das células-tronco para regiões específicas do epitélio seminífero. A interação entre BMP4 e seu receptor ALK3 regula uma via de transdução de sinal, que induz a expressão de c-kit, seguida pela diferenciação da espermatogônia A indiferenciada (Pellegrini et al, 2003).

Ja o fator Plzf (*promyelocytic leukemia zinc-finger*) é um repressor de transcrição que regula o estado epigenético das células indiferenciadas. Esse fator foi identificado como essencial para a manutenção de auto-renovação das células-tronco (Buaas et al., 2004). Isso foi confirmado no epitélio seminífero por Costoya e colaboradores (2004), que demonstraram que o Plzf é requerido para regular a auto-renovação e manutenção do *pool* de espermatogônias-tronco. O Plzf parece ser expresso em tipos celulares que não expressam ciclina D<sub>1</sub> e/ou D<sub>2</sub>, conhecidas por serem expressas em espermatogônias em diferenciação, sugerindo então serem as espermatogônias reguladas pelo Plzf as mais indiferenciadas.

Finalmente, a Ngn 3 é um fator de transcrição expresso especificamente em espermatogônias do tipo A indiferenciadas (Yoshida et al., 2004), sendo expresso em células que estão presentes em todos os estádios do epitélio seminífero, observadas com pouca frequência, e presentes em clones pequenos de células 2N. Além das características típicas de células indiferenciadas, as células positivas para Ngn3 apresentaram-se negativas para o receptor c-kit. Após a transição para células em diferenciação, a expressão de neurogenina 3 é suprimida. Recentemente, a Ngn3 foi utilizada, em camundongos, na caracterização de espermatogônias-tronco em funcionamento normal, e após drástica depleção de células germinativas (Yoshida, 2007). Os resultados sugerem que espermatogônias que expressam uma quantidade de Ngn 3 maior são na verdade espermatogônias-tronco potenciais, que sofreriam auto-renovação apenas durante a regeneração do epitélio seminífero, quando este é danificado.

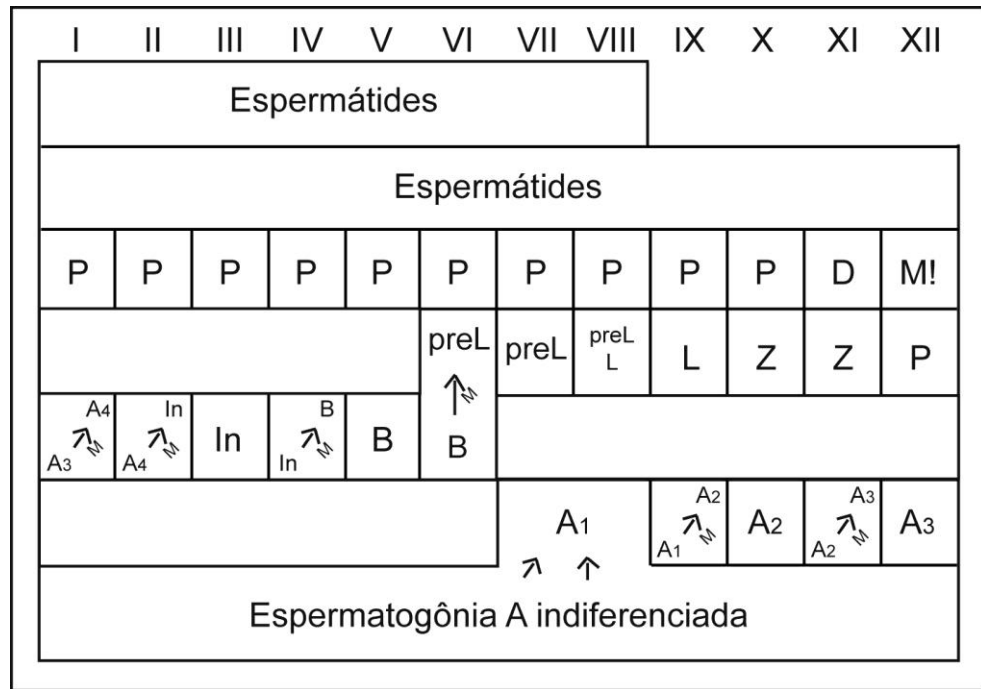


#### 1.4. Estádios do ciclo do epitélio seminífero

A classificação das secções transversais de túbulos seminíferos em estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) é uma ferramenta de grande valia para o estudo da cinética das células germinativas, inclusive das espermatogônias (Russell et al, 1990; de Rooij, 1998). Ela permite investigar a dinâmica, a progressão e a expansão das células em um determinado espaço de tempo. A forma de classificação mais utilizada em camundongos é conhecida como método da vesícula acrossômica, e permite o reconhecimento de doze estádios (Figura 2) a partir da observação das diferentes evoluções morfológicas nucleares e acrossômicas das espermátides.

Como exemplo de eventos ocorrendo em estádios específicos do CES, temos a formação de espermatogônias do tipo  $A_1$ , que ocorre por diferenciação celular a partir das espermatogônias  $A_{al}$  nos estádios VII e VIII (Figura 2). Uma vez que as espermatogônias do tipo  $A_1$  tenham sido formadas, as divisões subseqüentes também são sincronizadas, novamente ocorrendo em estádios específicos do ciclo espermatogênico. As espermatogônias  $A_1$  dividem-se para formar  $A_2$  no estágio IX, estas por sua vez formam as espermatogônias  $A_3$  no estágio XI, sendo finalmente as espermatogônias  $A_4$  formadas no estágio I do próximo ciclo. Estas últimas se dividem em espermatogônias  $I_n$  nos estádios II-III, dando origem às espermatogônias do tipo B no estágio IV (Figura 2).

No passado, os diferentes tipos de espermatogônias do tipo A não podiam ser reconhecidos morfológicamente, tampouco existiam marcadores moleculares específicos para estas células. No entanto, sabendo que os diferentes tipos celulares estavam presentes em estádios específicos, as espermatogônias podiam ser identificadas de forma indireta. Por exemplo, numa secção transversal de túbulo seminífero de camundongos no estágio XII podem ser observadas as espermatogônias do tipo  $A_{is}$ ,  $A_{pr}$ ,  $A_{al}$  (presentes em todos os estádios, embora em número pequeno) e as espermatogônias do tipo  $A_3$  (Figura 2). Hoje, com o uso de microscopia de luz de alta resolução (MLAR), é possível identificar as células independentemente dos estádios. Estudos das gerações espermatogoniais já podem ser realizados em animais que não possuem espermatogênese completa (Drumond et al, 2011), ou em animais nos quais os estádios do CES não podem ser identificados (Bolden-Tiller et al., 2007; Zallio 2009).

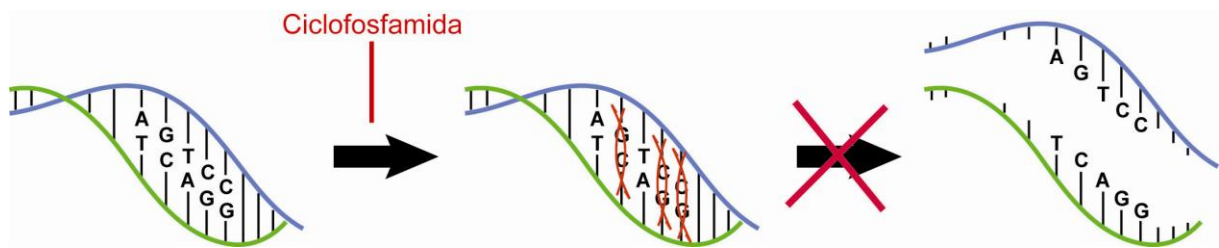


**Figura 2** – Associações celulares durante os XII estádios do CES de camundongos. As espermatogônias A indiferenciadas, que estão presentes em todos os estádios do ciclo, e se dividem entre os estádios X e III. As espermatogônias do tipo A em diferenciação (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub>) estão presentes e se dividem (m, mitose) em estádios específicos do ciclo. Os espermatócitos formados vão passar pelas fases da prófase meiótica (preL, preleptoteno; L, leptóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno; D, diplóteno), e as espermátides pelas 16 etapas de diferenciação (uma por estádio). Os tipos celulares presentes na mesma coluna são sempre encontrados juntos e constituem um estádio do ciclo. M!, divisões meióticas I e II.

### 1.5. O uso da ciclofosfamida e os seus efeitos colaterais na reprodução masculina

A ciclofosfamida é um agente alquilante, pertencente ao grupo de drogas conhecido como mostardas nitrogenadas, assim denominadas por terem sido criadas a partir do gás mostarda, muito utilizado na Segunda Guerra Mundial (Colvin, 2003). Essa droga reage fortemente com as bases guanina presentes no DNA, adicionando um grupo alquil ( $C_nH_{2n+1}$ ) às bases nitrogenadas. A reação causa uma ligação cruzada entre as duas fitas do DNA, não permitindo a abertura da dupla hélice para que haja replicação da molécula de DNA (Figura 3). O mecanismo de reparo da célula, ao detectar dano no DNA, induz a morte das células afetadas (Colvin, 2003).

As células que apresentam maior sensibilidade ao dano causado pelos agentes alquilantes são aquelas que estão em rápida atividade de proliferação, como as células cancerígenas (Colvin, 2003). Por esse motivo, a ciclofosfamida vem sendo amplamente empregada para o tratamento de neoplasias como linfomas, mielomas, leucemias, neuroblastomas, carcinoma de mama, dentre outros (Ref.:Bula que acompanha o medicamento). Esta droga também pode ser utilizada no tratamento de doenças auto-imunes, como o lupus eritematoso sistêmico, a anemia hemolítica e a artrite reumática.



**Figura 3** – Ação da ciclofosfamida na molécula de DNA. Promovendo a ligação cruzada entre as duas fitas, através da ligação nas bases guanina, a droga impede que haja abertura da molécula para duplicação do DNA.

Uma séria reação ao tratamento com agentes alquilantes é o dano às células germinativas. A bula que acompanha a droga ciclofosfamida afirma no tópico “advertências” que “A ciclofosfamida pode causar infertilidade em ambos os sexos, dependendo da dose e do tempo de duração do tratamento...”, e afirma ainda que “A infertilidade pode ser reversível”. Estudos demonstraram que os efeitos da ciclofosfamida são dependentes da dose aplicada, sendo que doses maiores produzem efeitos mais fortes (Ref.:Bula que acompanha o medicamento), e que o uso prolongado pode resultar em infertilidade permanente.

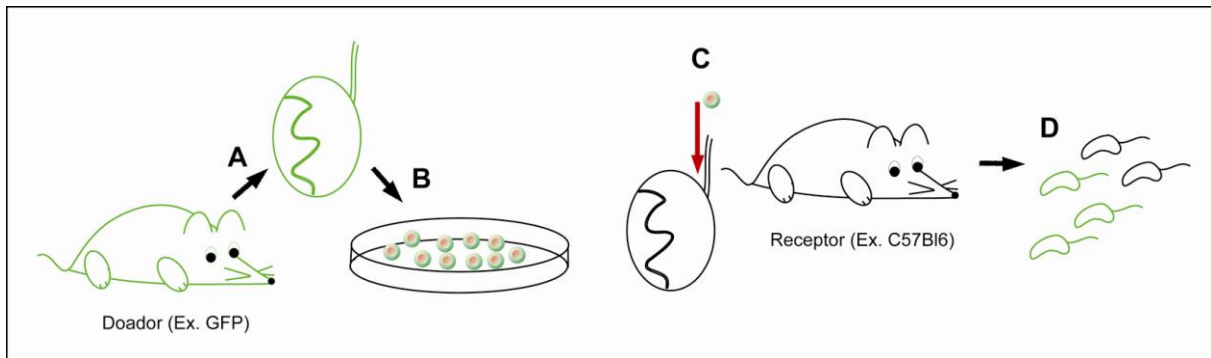
Experimentos foram também realizados em ratos e camundongos, na tentativa de explicitar os danos causados nas células germinativas pela ciclofosfamida. Lu e Meistrich (1979), por exemplo, estudaram os efeitos causados por diferentes drogas quimioterápicas, dentre elas a ciclofosfamida, na reprodução de camundongos C3H, após a aplicação de uma única dose. Esses pesquisadores encontraram que com uma dose de 200mg de ciclofosfamida por Kg de peso corporal dos animais (mg/Kg) as espermatogônias em diferenciação do tipo  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In e B, e parte dos espermatócitos do tipo pré-leptótenos, foram totalmente eliminados, enquanto as espermatogônias do tipo  $A_1$  e  $A_{a1}$  foram parcialmente danificadas, e as espermatogônias  $A_{is}$  e  $A_{pr}$  não foram alteradas. Apesar de não terem sido capazes de reconhecer especificamente os tipos espermatogoniais, os autores chegaram a essa conclusão ao analisar os diferentes tipos de espermatócitos presentes 11 dias após a injeção, e prevendo assim quais eram as células que estavam sendo eliminadas no momento da injeção. O trabalho também mostrou que com uma única dose de 100mg/Kg de ciclofosfamida a contagem de espermatozoides foi fortemente reduzida 29 dias após o tratamento, mas voltou à contagem normal, prevista para os animais controle, 56 dias após o tratamento (Lu & Meistrich, 1979).

Cai e colaboradores (1997) estudaram, em ratos machos, a indução de apoptose causada pela ciclofosfamida em células germinativas. Eles encontraram que o pico de apoptoses aconteceu entre 12 e 24 horas após a aplicação de uma dose da droga. Também observaram que as espermatogônias e os espermatócitos sofreram um número muito maior de apoptose induzida por ciclofosfamida, do que as espermátides.

É importante destacar que, uma eventual recuperação da produção espermática em pacientes que apresentam azoospermia ou oligospermia ao final do tratamento está relacionada com a sobrevivência das espermatogônias-tronco, e com a sua habilidade de se diferenciar em células germinativas mais avançadas, formando espermatozóides saudáveis. Por isso, se torna importante o estudo dos efeitos da ciclofosfamida não só na reprodução como um todo, mas principalmente os efeitos causados na linhagem espermatogonial.

#### **1.6. Transplante de células germinativas**

O transplante de espermatogônias é uma abordagem experimental que consiste na remoção de células-tronco do testículo de um animal doador e a transferência das mesmas para o testículo de um receptor, onde estas células irão se desenvolver e formar espermatozóides maduros com características genéticas do doador (Figura 4). Essa nova e promissora técnica foi inicialmente utilizada em camundongos por Brinster e colaboradores (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994) e tem proporcionado enormes possibilidades para o estudo tanto da biologia das células-tronco quanto do processo espermatogênico em si (Parreira et al., 1998; Hausler & Russell, 1999; Izadyar et al., 2000; Brinster, 2002; Dobrinski, 2005a,b; McLean, 2005). Antes de serem transplantadas, as células germinativas são isoladas, utilizando-se para isso digestão enzimática dupla (tripsina e colagenase) (Meistrich et al, 1973; Meistrich & Trostle, 1975). Apesar dos avanços na área, as técnicas de isolamento realizadas a partir de animais adultos, não têm conseguido, até o momento, obter suspensões celulares com uma concentração alta das espermatogônias-tronco.



**Figura 4** – Transplante de espermatogônias de um camundongo doador, exemplo GFP, para um camundongo receptor, exemplo C57Bl6. **A)** Coleta dos testículos do animal doador; **B)** Obtenção de suspensão celular, rica em espermatogônias, a partir dos testículos coletados; **C)** Injeção da suspensão celular nos testículos do animal receptor; **D)** Um determinado período após o transplante o animal receptor passa a produzir espermatozóides com a carga genética do animal doador (verdes), além dos seus próprios espermatozóides (pretos). GFP (*Green Fluorescent Protein*), proteína fluorescente verde.

O sucesso do transplante depende dos tipos celulares contidos na suspensão obtida (Oatley & Brinster, 2006). As suspensões celulares consideradas como ideais são aquelas que possuem espermatogônias-tronco saudáveis, presentes em alta concentração, e um número baixo de espermatócitos e espermátides. Nesse sentido, podemos citar diferentes modelos de animais doadores que vêm sendo experimentados nos últimos anos. O emprego de animais jovens, por exemplo, se revelou como um modelo eficiente, fácil de ser obtido e de baixo custo financeiro (Shinohara et al., 2001; McLean et al., 2003). Nestes animais a espermatogênese ainda não está completa, o que facilita a obtenção de *pools* de células-tronco. Apesar de serem considerados bons doadores, é importante estar atento à idade ideal do animal para obtenção das células a serem transplantadas, uma vez que espermatogônias obtidas a partir de animais muito jovens podem não estar presentes em quantidade ideal, além de não serem maduras o suficiente para produzir uma alta eficiência de transplante (McLean et al., 2003).

Conforme já foi dito, o uso de animais adultos como doadores também tem sido empregado, no entanto, por apresentarem o epitélio seminífero completo, com todas as células germinativas presentes, os transplantes realizados a partir destes animais não resultam em altas eficiências de colonização (Ogawa et al., 2003), sendo necessária a utilização da separação celular através de Percoll (Koh et al., 2004). Uma alternativa ao uso do Percoll seriam tratamentos experimentais que eliminem as células germinativas mais diferenciadas, mantendo as espermatogônias-tronco saudáveis, aumentando assim a proporção de células-tronco que será injetada nos animais receptores. O criptorquidismo experimental, é um exemplo de técnica que pode provocar a seleção de

espermatogônias, pois o aumento da temperatura testicular leva à depleção das células germinativas mais avançadas, sem causar dano às espermatogônias indiferenciadas (Nishimune et al., 1978; de Rooij et al., 1999). Alguns experimentos demonstram o sucesso do emprego desses animais como doadores de células-tronco para transplante (de Rooij et al., 1999; Shinohara et al., 2000; Orwig et al., 2008). Além dos animais criptorquídicos, alguns animais mutantes também têm sido utilizados em experimentos de transplante (de Rooij et al., 1999). Os camundongos mutantes para o gene *steel* (Sl/SI), por exemplo, possuem células germinativas saudáveis, que expressam o receptor para SCF, c-kit, no entanto apresentam células de Sertoli defeituosas na produção do SCF, fazendo com que esses animais sejam desprovidos de células germinativas mais avançadas (Brannan et al., 1992). Como a alteração desses animais é no componente somático dos testículos, e não nas células germinativas, estas células podem ser transplantadas com sucesso.

Outro fator importante para o sucesso do transplante é a escolha do receptor adequado. O microambiente testicular dos animais receptores tem um papel crucial na dinâmica e na eficiência da colonização, e no desenvolvimento das células germinativas transplantadas. Embora as células germinativas dos animais doadores sejam capazes de colonizar o testículo de um animal receptor normal, a eficiência do transplante depende também do sucesso na competição por nichos disponíveis nos túbulos seminíferos, entre as células germinativas transplantadas e as células germinativas endógenas (Shinohara et al., 2002). O receptor ideal para o transplante de espermatogônias é aquele cujos túbulos seminíferos contêm apenas células de Sertoli, normais, pois este aspecto garante a acessibilidade dos nichos às células germinativas dos doadores (Brinster et al., 2003).

No que diz respeito aos animais receptores, podemos citar algumas técnicas aplicadas com o fim de melhorar as condições do microambiente testicular receptor. A primeira delas, que vem sendo utilizada desde os primeiros experimentos de transplante de células germinativas até hoje, é o uso do tratamento com o quimioterápico bussulfan como forma de deprimir a produção endógena de células germinativas, permitindo que apenas as células de Sertoli sobrevivam nos testículos (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Nagano et al., 1999; Zhang et al., 2006). Apesar de ser uma técnica bem sucedida no que diz respeito à eliminação das células germinativas, sem afetar o componente somático, o bussulfan debilita muito os animais receptores. Vários trabalhos relatam a necessidade de transplante de células da medula óssea para auxiliar na recuperação destes animais

(Ogawa et al., 1999; Udagawa et al., 2001). Uma alternativa ao tratamento dos animais receptores com bussulfan seria a utilização de animais mutantes. Os camundongos mutantes para o *locus W/W*, por exemplo, apresentam alterações genéticas em suas células germinativas, não sendo capazes de expressar o receptor c-kit para o fator SCF, produzido pelas células de Sertoli (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Parreira et al. 1998; Nagano et al., 1999). Estes animais, apesar de desprovidos de células germinativas, possuem células de Sertoli em perfeito estado funcional, sendo, por isso, receptores ideais para as células-tronco dos animais doadores. Apesar de ser uma técnica biologicamente viável, a obtenção e criação dos animais mutantes requer um alto investimento financeiro.

Recentemente, o emprego da radiação para depleção das células germinativas nos testículos dos animais receptores se revelou uma técnica mais adequada, por ser menos prejudicial à saúde dos animais do que o tratamento com o bussulfan, e mais acessível, em termos financeiros, do que a obtenção dos animais mutantes. Por muitos anos o efeito da radiação na reprodução masculina vem sendo estudado, mostrando como ela afeta as células germinativas em proliferação, sendo elas espermatogônias-tronco ou não (Cattanach, 1974; Withers et al., 1974; Hasegawa, et al., 1997). Esses estudos também mostram que doses de radiação fracionada são mais eficientes na depleção das células germinativas do que doses únicas (Cattanach, 1974; Withers et al., 1974; de Ruiter-Bootsma et al., 1977; Meistrich et al., 1984). Dessa forma, pesquisadores têm optado pelo uso da radiação (Zhang et al., 2006; Barroca et al., 2009), representando uma excelente alternativa para a produção de animais receptores.

A técnica de transplante de células germinativas tem sido utilizada para verificar a funcionalidade espermatogênica das espermatogônias-tronco, e a possível morte celular causada após tratamentos citotóxicos, eliminando-se a possibilidade de danos nas células Sertoli (Zhang et al., 2007), uma vez que o receptor fornece um nicho saudável para as spermatogônias dos doadores se desenvolverem. Este método foi utilizado para se determinar a queda no número de spermatogônias-tronco após uma única injeção da droga busulfan, em camundongos, e subsequente recuperação dessas células após transplante (Kanatsu-Shinohara et al., 2006). O transplante espermatogonial também foi utilizado em macacos Rhesus (Hermman et al., 2007), tratados com busulfan, para se acessar a funcionalidade das espermatogônias do tipo A indiferenciadas e como essas células se comportavam após o tratamento com o quimioterápico.

## 2. Justificativa e Objetivos

O câncer vem desafiando os médicos e pesquisadores da área de saúde a muitos anos, devido à sua ocorrência nos mais variados tipos de tecidos do corpo humano, e à agressividade com que muitas vezes acomete os pacientes. Dentre os tratamentos empregados contra esta doença, medicamentos como os agentes alquilantes são os mais utilizados, podendo ser combinados ou não com outras formas de tratamento. Como visto na introdução, algumas drogas alquilantes agem nas células que estão em atividade mitótica constante, não permitindo a replicação das moléculas de DNA, conseqüentemente induzindo à morte celular.

Apesar de eficientes contra as neoplasias, os agentes alquilantes acarretam drásticas alterações nas células germinativas dos pacientes. Logo após o início do tratamento é possível ainda se observar espermatozóides sendo produzidos por até 2 meses, devido a certa resistência das células germinativas em estágios mais avançados, como as espermatídes (revisão em Meistrich, 2009). No entanto, mesmo em doses baixas, as drogas levam à redução da produção espermática por até 3 meses após o fim do tratamento. Em um regime agressivo de quimioterapia pode ocorrer forte redução do número de espermatozóides, ou até azoospermia do paciente. O tempo de duração da azoospermia será então relacionado com a dose recebida pelo paciente, podendo durar de 1 a 3 anos, ou por um período mais prolongado, muitas vezes sendo permanente. Estudos em camundongos revelaram que o intervalo necessário para recuperação da fertilidade está diretamente relacionado ao grau de morte celular induzida nas espermatogônias-tronco (Meistrich, 1982). Assim sendo, acredita-se que a eventual recuperação da produção espermática depende da sobrevivência das espermatogônias-tronco, e da sua habilidade de se diferenciar em células mais avançadas, produzindo espermatozóides saudáveis.

A ciclofosfamida é um exemplo de agente alquilante, que tem sido empregado no tratamento de várias neoplasias, e também de doenças auto-imunes. Experimentos realizados em roedores



revelaram que a ciclofosfamida leva a morte principalmente de espermatogônias em diferenciação, e espermatócitos do tipo pré-leptótenos (Lu & Meistrich, 1979), principalmente durante as primeiras 24 horas após a injeção da droga (Cai et al., 1997). Os estudos em camundongos revelam ainda que, assim como em pacientes, a ciclofosfamida reduz drasticamente a quantidade de espermatozóides produzida pelo epitélio seminífero, após o tratamento, porém essa situação pôde ser revertida em animais tratados com doses menores (Lu & Meistrich, 1979).

Nesse sentido, o estudo da ação dessa droga nas células germinativas, principalmente nas espermatogônias, se torna extremamente importante, visando verificar tanto o impacto deletério nas células germinativas, quanto a possibilidade de recuperação do processo espermatogênico, dependendo do tipo de tratamento utilizado.

### **Objetivo Geral**

Estudar as alterações causadas pelo tratamento com a ciclofosfamida nas células espermatogênicas de camundongos, e avaliar o grau de recuperação das células germinativas após o fim do tratamento.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos de diferentes regimes de tratamento com uma única dose de ciclofosfamida;
- Estudar o dano causado nas células germinativas após tratamentos envolvendo múltiplas doses de ciclofosfamida;
- Avaliar a recuperação de parâmetros como peso testicular e produção espermática, após o fim do tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida;
- Verificar a função espermatogênica das espermatogônias-tronco que sobreviveram ao tratamento, através do transplante de células germinativas.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Animais

Para os tratamentos com ciclofosfamida, foram utilizados camundongos machos, adultos, da linhagem C57BL6, provenientes da colônia do Departamento de Radiologia Oncológica Experimental, do MD Anderson Cancer Center (ERO colony, Houston/TX, EUA). Os animais foram obtidos com aproximadamente 6 semanas de idade, ambientados por uma semana, e mantidos no biotério do departamento durante todo o tratamento, até o momento do sacrifício. Cada animal recebeu um número de identificação individual, impresso em brinco de alumínio. O experimento foi aprovado pelo comitê de ética do MD Anderson Cancer Center (IACUC, *Institution Animal Care and Use Comitee*).

Para os experimentos de transplante foram preparados grupos de animais doadores de células germinativas, e grupos de animais receptores das suspensões celulares preparadas a partir dos testículos dos camundongos doadores.

- *Camundongos doadores:*

Como doadores de células germinativas, foram utilizados camundongos transgênicos para a produção da proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein* – GFP), para que as células dos doadores pudessem ser reconhecidas no animal receptor, após o transplante.

Foram utilizados quatro grupos experimentais compostos de camundongos GFP: a) jovens, b) adultos não tratados, c) adultos experimentalmente criptorquídicos e d) adultos tratados com ciclofosfamida.

- a) Animais jovens:**

Foram realizados dois experimentos de transplante, nos quais foram utilizados 5 camundongos doadores, com idades entre 14 e 16 dias, para cada experimento, totalizando 10 animais. No momento da coleta os animais foram pesados, anestesiados (mistura de

ketamina e xilazina a 0,10 mL/10 g de peso corporal) e sacrificados. A suspensão celular foi então obtida a partir dos testículos coletados.

**b) Animais adultos não tratados:**

Foram utilizados 5 animais, com aproximadamente 8 semanas de idade. No momento da coleta os animais foram pesados e anestesiados, e após a coleta procedeu-se a eutanásia por deslocamento cervical. A suspensão celular foi então obtida a partir dos testículos coletados.

**c) Animais experimentalmente criptorquídicos:**

Foram utilizados 10 animais, que tinham aproximadamente 8 semanas de idade no dia da cirurgia. Para o procedimento de cirurgia de criptorquidismo, os animais foram pesados e anestesiados com ketamina e xilazina (0,1mL/10g de peso corporal). Foi realizada tricotomia na região abdominal, e em seguida a região foi higienizada com Iodo Povidine. Com bisturi cirúrgico, foi feita uma incisão na região pélvica do animal, de aproximadamente 1,5 cm. Ambos os testículos foram, separadamente, retirados do escroto e amarrados à parede abdominal com linha de seda, sendo que o ponto de fixação foi localizado entre o testículo e o epidídimo.

Os animais foram mantidos criptorquídicos por 8 semanas, até o dia do transplante, quando foi então obtida suspensão celular a partir dos testículos desses animais. No momento da coleta os animais foram pesados, receberam a mesma dose de anestésico do procedimento cirúrgico, e procedeu-se a eutanásia. Baseado em experimentos prévios (dados não publicados), apenas testículos com valores de peso abaixo de 30 mg foram utilizados como doadores para o transplante.

**d) Animais adultos tratados com ciclofosfamida:**

Foram realizados dois experimentos de transplante. Inicialmente previu-se o uso de 5 animais doadores para cada transplante, porém, devido à morte de um dos animais, utilizamos 5 doadores no primeiro experimento, e 4 doadores no segundo, totalizando 9 animais. Os doadores tinham aproximadamente 8 semanas de idade ao início tratamento com ciclofosfamida. Os animais foram submetidos a um tratamento com sete doses de ciclofosfamida (150mg/Kg por dose), administradas por via oral a cada quatro dias. Os animais foram pesados todos os dias antes da administração da droga. Quatro dias após a última dose (28º dia de tratamento) os animais foram sacrificados e a suspensão celular foi obtida a partir

do testículo desses animais e injetada nos animais receptores, no mesmo dia. No momento da coleta os animais foram pesados, anestesiados e sacrificados.

Além dos grupos de animais preparados para serem utilizados como doadores de células germinativas para os transplantes, outros grupos de animais foram preparados, seguindo-se exatamente os mesmo critérios estabelecidos nos grupos (a), (b), (c) e (d) anteriormente citados, para serem processados para análise sob microscopia de luz de alta resolução - MLAR (n=4).

- *Camundongos receptores:*

Como receptores para o transplante de espermatogônias foram utilizados ao todo 38 camundongos machos, adultos. Estes animais tiveram sua espermatogênese endógena deprimida por tratamento com doses fracionadas de radiação  $\gamma$ , utilizando como fonte de radiação o Cs<sup>137</sup>. Os animais receberam a primeira dose de 1,5 Gy e uma segunda dose de 12 Gy, aplicada 24 horas após a primeira. Este protocolo foi baseado nos experimentos de Zhang e colaboradores (2006).

Os animais receberam as doses de radiação nas regiões pélvica e do escroto, a fim de garantir a exposição dos testículos. O restante do corpo do animal foi protegido com placa de cobre. Não foi necessário anestesiá-los no momento da irradiação, uma vez que foi possível a imobilização dos mesmos dentro de uma caixa de acrílico.

Os animais irradiados foram separados nos seguintes grupos:

- Animais controle de 3 a 4 semanas após a radiação (n=3);
- Animais controle de 11 semanas após a radiação (n=3);
- Animais que receberam células de animais jovens (n=7);
- Animais que receberam células de animais adultos não tratados (n=6);
- Animais que receberam células de animais cirurgicamente criptorquídicos (n=7);
- Animais que receberam células de animais tratados com ciclofosfamida (n=12).

O transplante foi realizado 3 a 4 semanas após o tratamento com radiação, e a injeção da suspensão celular foi feita manualmente, via ducto eferente. Os animais transplantados foram sacrificados 8 semanas após o transplante (aproximadamente 11 semanas após a radiação). No momento do sacrifício os animais foram pesados e receberam a mistura de ketamina e xilazina (0,10

mL/10 g de peso corporal). Os testículos foram coletados e pesados, e a eutanásia foi realizada após a coleta.

### 3.2. Tratamentos com a ciclofosfamida

- Tratamento com dose única:

Foram utilizados ao todo 33 camundongos. Os animais receberam injeções de ciclofosfamida (Cytoxan®, Bristol-Myers Squibb Co), por via oral (p.o. - agulha de gavagem 22G1”) e intraperitoneal (i.p. - agulha de 26G½”). Foram injetadas doses de 150 e 200 mg/Kg de peso corporal do animal, assim determinadas por base em resultados previamente obtidos no nosso laboratório. O peso corporal dos animais foi obtido no dia da injeção da droga (dia 0) e duas vezes por semana (dias 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 após o tratamento), até o dia do sacrifício.

Os animais foram divididos em onze (A-K) grupos (n=3), de acordo com a dose recebida, a via de administração utilizada e o dia em que os animais foram sacrificados (Tabela 1). Animais dos grupos controle (A-C) receberam injeções de salina a 0,9%.

**Tabela 1** – Grupos de animais submetidos ao tratamento com dosagem única de ciclofosfamida. Dias do sacrifício contados após a aplicação da droga. p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal; GMA, resina glicol metacrilato; PAS, coloração com ácido periódico e reagente de Schiff; TUNEL, (*terminal dUTP nick end-labeling*) detecção de apoptose através de marcação de fragmentação de DNA. (N=3)

Grupo	Dose (mg/kg)	Via	Dia do sacrifício	Ferramenta de avaliação
A	Salina 0,9%	p.o.	3	TUNEL / PAS-hematoxilina
B			11	histologia em GMA
C			28	histologia em parafina e contagem de espermatozóides
D	150	p.o.	1	TUNEL / PAS-hematoxilina
E			2	
F			3	
G			11	histologia em GMA
H		i.p.	28	histologia em parafina e contagem de espermatozóides
I				
J				
K	200	i.p.		

• Tratamento com múltiplas doses, aplicadas a cada 5 dias:

Foram utilizados ao todo 65 camundongos. Diferentes grupos de animais receberam 6 injeções de ciclofosfamida por via oral, ou 6 injeções por via intraperitoneal, em doses de 150mg/Kg de peso corporal, por injeção. Durante o tratamento, os animais foram separados em grupos de acordo com a via de administração utilizada (Tabela 2). Os animais do grupo controle receberam injeções de salina a 0,9% através de via oral, ou intraperitoneal.

**Tabela 2** – Grupo de animais submetidos ao tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida, com intervalos de 5 dias entre cada dose. p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal.

Via (n)	1ª injeção	2ª injeção	3ª injeção	4ª injeção	5ª injeção	6ª injeção
Controle (9)	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 25
p.o. (28)						
i.p. (28)						

Os animais foram pesados em todos os dias de injeção e, na primeira semana de tratamento, em intervalos entre as injeções, (dias 0, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, após o início do tratamento), a fim de se avaliar a toxicidade do tratamento para os animais. Após o tratamento, os animais foram agrupados (Tabela 3), de acordo com a data de sacrifício. Cada grupo recebeu três animais do grupo controle, três animais do grupo p.o., e três animais do grupo i.p. (n=9), exceto para os animais que foram sacrificados aos 28 dias (para avaliação sob MLAR), e aos 62 e 65 dias, que não receberam animais do grupo controle (n=6).

**Tabela 3** – Reagrupamento dos animais, após o tratamento com múltiplas doses de Ciclofosfamida, com intervalos de 5 dias entre cada dose. GMA, resina glicol metacrilato; MLAR, microscopia de luz de alta resolução; PAS, coloração com ácido periódico e reagente de Schiff; TUNEL, (*terminal dUTP nick end-labeling*) detecção de apoptose através de marcação de fragmentação de DNA. (N=3)

Dia do sacrifício (dias após a primeira injeção)					
28 Dias (n=9 / 6)	59 Dias (n=9)	62 Dias (n=6)	65 Dias (n=6)	70 Dias (n=9)	81 Dias (n=9)
histologia em GMA, TUNEL/PAS-hem, contagem de espermatozóides, MLAR (n=6)	histologia em parafina e contagem de espermatozóides				

Os dias do sacrifício foram determinados prevendo-se a recuperação da produção espermática, a partir da sobrevivência dos diferentes tipos espermatozoniais potencialmente

afetados pela ciclofosfamida após o tratamento (Lu & Meistrich, 1979; de Rooij, 1998), conforme a seguir:

<b>Dia do sacrifício</b>	<b>Dias após a última injeção</b>	<b>Tipo celular produzindo espermatozoides</b>
----- 59 -----	----- 34 -----	Espermatogônia A <sub>2</sub> , estágio IX
----- 62 -----	----- 37 -----	Espermatogônia A <sub>alinhada</sub> , estágio VI
----- 65 -----	----- 40 -----	Espermatogônia A <sub>pareada</sub> , estágio I
----- 70 -----	----- 45 -----	Espermatogônia A <sub>isolada</sub> , estágio VI
----- 81 -----	----- 56 -----	Espermatogônia A <sub>isolada</sub> , início do ciclo

• Tratamento com múltiplas doses, aplicadas a cada 4 dias:

Foram utilizados ao todo 20 camundongos. Os animais do grupo tratado receberam 7 injeções de ciclofosfamida, na dosagem de 150mg/Kg de peso corporal, por injeção. Animais do grupo controle receberam 7 injeções de salina a 0,9%. Durante o tratamento os animais foram divididos em grupos, de acordo com o tratamento recebido (Tabela 4).

**Tabela 4** – Grupo de animais submetidos ao tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida, com intervalos de 4 dias entre cada dose. p.o., por via oral.

<b>Tratamento (n)</b>	<b>1<sup>a</sup> injeção</b>	<b>2<sup>a</sup> injeção</b>	<b>3<sup>a</sup> injeção</b>	<b>4<sup>a</sup> injeção</b>	<b>5<sup>a</sup> injeção</b>	<b>6<sup>a</sup> injeção</b>	<b>7<sup>a</sup> injeção</b>
<b>Controle ( 2 )</b>	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 16	Dia 20	Dia 24
<b>p.o. ( 10 )</b>							

Os animais foram pesados em todos os dias de injeção (dias 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, após o início do tratamento), a fim de se avaliar a toxicidade do tratamento para os animais. Após o tratamento, os animais foram agrupados (Tabela 5), de acordo com a data de sacrifício.

**Tabela 5** – Reagrupamento dos animais, após o tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida, com intervalos de 4 dias entre cada dose. GMA, resina glicol metacrilato.

<b>Data de sacrifício (dias após a primeira injeção)</b>	
<b>28 Dias (n=5 + 1 controle)</b>	<b>81 Dias (n=5 + 1 controle)</b>
contagem de espermatozoides, histologia com GMA,	contagem de espermatozoides, histologia com parafina,

Além disso, 10 camundongos foram submetidos ao mesmo regime de tratamento (7 injeções de 150p.o., a cada 4 dias), e sacrificados 4 dias após a última dose. Esses animais tiveram seus testículos coletados para obtenção de suspensão celular, que foi injetada em animais receptores, para verificar a capacidade de colonização e diferenciação destas células.

### 3.3. Transplante de células germinativas

- Obtenção da suspensão celular:

Após a coleta, em uma placa de cultura estéril, os testículos tiveram suas túnicas albugíneas removidas e os parênquimas testiculares foram pesados todos juntos. Em seguida os testículos foram colocados em uma garrafa estéril, com 15mL de solução de enzima colagenase a 0,5% (Worthington – 233U/mg) em meio DFD (meio de cultura estéril DMEM/F12 (Gibco – Cat.# 11330-032) enriquecido com aminoácidos, antibióticos e soro, contendo DNase I (Sigma – Cat.# DN-25) na concentração de 100µg/mL). A primeira digestão, com colagenase, foi realizada por 20 minutos, em agitador automático aquecido a 35°C por banho-maria, nas velocidades de 120rpm (jovens e adultos não tratados) ou 300rpm (adultos tratados com ciclofosfamida e criptorquidismo). Foram utilizadas velocidades de agitação diferentes para grupos de animais adultos tratados, por esses animais possuírem uma estrutura testicular diferente. As velocidades de agitação foram determinadas, baseando-se em experimentos prévios (dados não publicados).

Em seguida, a solução sobrenadante foi retirada, e sobre o tecido foram adicionados 15mL de solução de enzima colagenase a 0,5% e enzima hialuronidase a 0,5% (Worthington – 550U/mg), em meio DFD, em agitador automático aquecido a 35°C, por 20 minutos, na velocidade de 120rpm. O tecido foi então lavado com solução estéril de tampão fosfato salina, para retirada das enzimas.

Finalmente, o tecido foi submetido a uma última digestão com 15mL de solução de enzima tripsina a 0,1% (Worthington – Cat.# 3704), ácido etileno glicol tetra-acético (*ethylene glycol tetracetic acid* – EGTA) a 1mM (Sigma – Cat.# E4378) e 100µg/mL de DNase I, em tampão fosfato salina. A digestão foi realizada por 10 minutos, em agitador automático aquecido a 35°C, na velocidade de 120rpm. Após a digestão, a solução foi homogeneizada com pipeta de plástico e a ação das enzimas foi neutralizada pela adição de 1,5mL de soro fetal bovino.

A solução final obtida foi filtrada com filtro de nylon de 40µm, para um tubo falcon de 50mL. Foi retirada uma alíquota da suspensão celular para contagem em microscópio de contraste de fase com



hemocítômetro, e o restante da suspensão foi centrifugado, à temperatura ambiente, na velocidade de 1000rpm, por 10 minutos. Depois de centrifugada a solução, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* de células restante foi re-suspendido com meio DFD, de acordo com a quantidade de células contadas anteriormente, para uma concentração final de  $2-6 \times 10^7$  células/mL de solução.

Após adição de solução de azul de tripan a 0,4% à suspensão celular final, foi possível verificar a viabilidade da suspensão obtida, através da contagem celular em hemocítômetro, considerando-se como mortas aquelas células coradas em azul. Os tubos contendo a suspensão celular foram mantidos em gelo antes e durante o processo de injeção no animal receptor.

- Injeção da suspensão celular:

No momento do transplante, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (0,1mL/10g de peso corporal) e foram colocados sobre um suporte que mantinha a parte abdominal mais elevada que o resto do corpo, para facilitar a cirurgia. Foi realizada tricotomia da região abdominal, seguida de higienização com Iodo Povidine. Com um bisturi foi feita uma incisão de aproximadamente um centímetro na região abdominal, no sentido longitudinal ao corpo do animal. Os testículos foram retirados pela cavidade abdominal, expostos e dissecados para melhor visualização dos ductos eferentes.

A injeção da suspensão celular nos testículos foi feita através da inserção de agulhas, produzidas a partir de capilares de vidro, nos ductos eferentes. A agulha estava conectada a um longo tubo de plástico, que por sua vez estava conectado a uma seringa de diâmetro grande (50mL), e a pressão de injeção se dava por pressionamento do embolo da seringa. Para melhor visualização do campo cirúrgico, a cirurgia foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

Após a injeção da suspensão celular, os testículos foram recolocados na cavidade abdominal, e a parede abdominal e a pele foram suturadas com linha de seda Vicryl 18". Os animais foram mantidos em observação até o término do efeito do anestésico, e em seguida foram alojados no biotério.

### **3.4. Coleta e fixação dos testículos**

Para todos os procedimentos de coleta, após serem pesados, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (6,7mg/mL) e xilazina (1,3mg/mL) a uma proporção de 0,10 mL por 10

gramas de peso corporal do animal e a eutanásia se deu após o procedimento de coleta, através de deslocamento cervical.

Nos estudos histológicos, para padronização do tratamento com ciclofosfamida, os testículos foram fixados em solução de Bouin por 30 minutos e, após esse período, foram seccionados transversalmente, sendo novamente colocados no mesmo fixador por mais 12 horas, à temperatura ambiente. Em seguida os tecidos foram transferidos para solução saturada de carbonato de lítio em álcool 70% e submetidos a várias trocas diárias, até completa descoloração do tecido. Finalmente os tecidos foram armazenados em álcool 70%, até o momento da inclusão.

A fim de se estudar a morfologia espermatogonial com detalhes mais apurados, análises do epitélio seminífero foram realizadas através da MLAR. Para isso, os animais foram submetidos ao processo de perfusão intravascular. Aproximadamente 15 minutos antes do procedimento de perfusão, injetou-se, pela via intraperitoneal, heparina (Liquemine Roche) na dosagem de 125 UI/kg de peso corporal. Após a anestesia, por meio de injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina (0,10 mL/10 g de peso corporal), procedeu-se à abertura da cavidade torácica com o objetivo de expor o coração. Um cateter (20G - 1,1mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular lavado com solução salina a 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Após a retirada do sangue com solução salina, que durou entre 5 a 10 minutos, iniciou-se o procedimento de fixação através da perfusão com glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M (pH 7,3). Após um período de perfusão de aproximadamente 25 minutos, os testículos foram retirados, pesados e recortados em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura. Estes fragmentos foram re-fixados por imersão no mesmo fixador por mais 12 a 24 horas, a 4° C. Este procedimento baseou-se em método já descrito por Sprando (1990) e Chiarini-Garcia & Meistrich (2008).

Para animais receptores do transplante, no momento da coleta, após serem pesados, os testículos tiveram suas túnicas albugíneas removidas e foram fixados com paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato salina a 0,01M, por 24 horas. Após esse período os testículos foram seccionados transversalmente, na região mediana do órgão, e colocados em tampão fosfato salina até o momento da inclusão. Antes de serem processadas para inclusão, as metades dos testículos foram novamente seccionadas transversalmente, aumentando-se assim a área testicular disponível para análises morfométricas.

### 3.5. Processamento histológico dos testículos

O material fixado com solução de Bouin foi submetido à inclusão em parafina e/ou em glicol metacrilato (GMA), conforme indicado nas tabelas 1, 3 e 5. Os blocos obtidos foram seccionados em cortes na espessura de 5 $\mu$ m, para confecção de lâminas.

As lâminas obtidas foram coradas com PAS (ácido periódico-reagente de Schiff), e contra-coradas com hematoxilina. A reação de PAS permite a melhor visualização da vesícula acrossômica, metodologia esta que vem sendo aplicada com sucesso para a classificação dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero. Para tanto, as lâminas foram colocadas em ácido periódico por 10 minutos, sendo rapidamente lavadas em água destilada após o contato com o ácido. Em seguida as lâminas foram colocadas em reagente de Schiff por 10 minutos, e em seqüência, colocadas em água corrente por 10 minutos. A coloração com hematoxilina foi feita por 15 segundos, após os quais as lâminas foram colocadas em água corrente por aproximadamente 5 minutos. Após a coloração, o material foi submetido a uma série de desidratação em álcool (70%, 80%, 2x 90%, 2x 100), e a uma substância solvente livre de água (Citrosolv ou xilol), sendo finalmente montada com Entellan (Merck – Cat.# 107961).

Os testículos de animais receptores do transplante, fixados em paraformaldeído a 4%, foram submetido à inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em cortes na espessura de 5 $\mu$ m, para confecção de lâminas. As secções foram colocadas em lâminas cobertas (Colorfrost®/Plus, Fisher Scientific – Cat.# 12-550-17).

As inclusões em parafina e glicol metacrilato, e a confecção das lâminas histológicas, foram realizadas pelo centro de histologia do Departamento de Radiologia Oncológica Experimental, do MD Anderson Cancer Center, (Houston/TX, EUA).

O material submetido a reações de TUNEL foi incluído em parafina, e os blocos seccionados em cortes de 5  $\mu$ m de espessura. As secções foram colocadas em lâminas cobertas (Colorfrost®/Plus, Fisher Scientific – Cat.# 12-550-17). As inclusões em parafina, e a confecção das lâminas, também foram realizadas pelo centro de histologia do Departamento de Radiologia Oncológica Experimental, do MD Anderson Cancer Center, (Houston/TX, EUA).

Os fragmentos de testículo preparados para MLAR foram submetidos à fixação secundária em tetróxido de ósmio (EMS, Hatfield, PA – Cat.# 19110) reduzido (tetróxido de ósmio a 1% em ferrocianeto de potássio a 1,5%) por 90 minutos, e em seguida desidratados em concentrações

crescentes de álcool (50°, 70°, 85°, 2 x 95° e 3 x 100°) e em acetona. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina Araldite 502 (EMS, Hatfield, PA – Cat.# 13900). Os tecidos incluídos em blocos foram seccionados em cortes histológicos na espessura de 1µm. As secções histológicas obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1%, montadas com Entellan (Merck – Cat.# 107961).

### 3.6. Contagem de espermatozóides testiculares

Para realização de contagem de espermatozóides testiculares, o testículo direito foi pesado, com túnica albugínea, e colocado em tubos de plástico, contendo 1 mL de água destilada. Em seguida o conteúdo dos tubos foi submetido a homogeneização, com homogeneizador Polytron (Brinkmann Instruments, Westbury/NY, EUA), por 30 segundos, mantendo as amostras em balde com gelo quando essas não estavam sendo homogeneizadas. Em seguida as amostras foram sonicadas com Sonicador Brason 20-kHz (Modelo W185, Heat Systems, Ultrasonic, Plainview/NY, EUA), durante 4 minutos, na calibragem número 7, sempre mantendo os tubos contendo as amostras em água com gelo. É importante ressaltar que apenas as espermátides alongadas mais avançadas (fases 13 a 16) e os espermatozóides são células resistentes ao processo de homogeneização, seguido por sonicação, de forma que a utilização desses processos objetivou eliminar as células não resistentes. A contagem de espermatozóides foi feita em microscópio de contraste de fase, utilizando o aumento de 40x. As amostras foram contadas em duplicatas, colocando-se 7µL retirados das amostras em cada lado de um hemocitômetro.

Para calcularmos o número de espermatozóides a seguinte fórmula foi aplicada:

$$M \times (N \div D) \times 10^4 \times (Vol.Hom. + (0,001 \times PT \div 1,05))$$

Onde: *M* = média dos valores contados

*N* = número de quadrados disponíveis para contagem na área analisada do hemocitômetro

*D* = número de quadrados que foram contados na área analisada do hemocitômetro

*Vol.Hom.* = Volume em que o tecido foi homogeneizado

*PT* = Peso Testicular

### 3.7. TUNEL e imunohistoquímica

Após o tratamento com ciclofosfamida, quantificamos a ocorrência de apoptoses espermatogoniais, e de pré-leptótenos, através da técnica de TUNEL (*Terminal dUTP nick end-labeling* - DeadEnd™ Colometric TUNEL System, Promega, USA – Cat.# G7130), seguindo o manual técnico que acompanha o kit de reação. Após a reação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Labs – Cat.# SK4100), as lâminas foram submetidas à lavagem em água destilada e foram coradas com PAS (ácido periódico-reagente de Schiff) e contra-coradas com hematoxilina, seguindo-se o mesmo protocolo utilizado no item 3.5 (Processamento histológico dos testículos). Como citado anteriormente, a reação de PAS permite a melhor visualização da vesícula acrossômica, tornando assim possível identificarmos os diferentes estádios do CES, e, conseqüentemente, determinar quais os tipos espermatogoniais estavam sofrendo apoptose.

Após o transplante, utilizamos a técnica de imunohistoquímica para reconhecermos as colônias produzidas pelas células dos animais doadores, nos testículos dos animais irradiados. Para isso, foram utilizados anticorpos marcadores específicos para diferenciação celular (anti-GCNA-1 – *germ cell nuclear antigen*, gentilmente cedidos pelo Dr George Enders), e marcadores específicos para a proteína fluorescente verde, presente nas células provenientes dos animais doadores (anticorpo policlonal coelho-anti-GFP, Cat.# NB600-303; Novus Biologicals). Cortes seriados foram marcados com os dois tipos de anticorpos separadamente, tornando assim possível identificar, dentre os túbulos que apresentavam diferenciação celular (positivos para GCNA-1), quais túbulos eram formados por células germinativas dos animais doadores (positivas para GFP).

As secções foram incubadas com os anticorpos primários (monoclonal rato anti-camundongo para proteína GCNA-1, na diluição 1:100; e policlonal coelho anti-GFP na diluição de 1:300) em câmara úmida, na temperatura de 4°C, durante 12 horas. Após incubação com os anticorpos primários, as secções foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-camundongo (Vector Labs – Cat.# PK6102, diluição 1:500), em temperatura ambiente, por um período de 30 minutos. Para detecção da ligação dos anticorpos, após a incubação com anticorpo secundário, as lâminas foram submetidas ao kit ABC, anti-coelho e anti-rato, (Vector Labs – Cat.# PK6102) por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente as secções foram reveladas com DAB (Vector Labs – Cat.# SK4100), lavadas em água destilada, e coradas hematoxilina. Após a coloração, as secções foram desidratadas e as lâminas foram montadas com meio de montagem permanente (Permount, Fisher

Scientific – Cat.# SP15-100). As lâminas produzidas foram analisadas sob microscópio de luz (Olympus BX-41).

### 3.8. Análises morfológicas e morfométricas

- Análise qualitativa:

As análises qualitativas, em parafina, foram realizadas para todos os animais que foram submetidos ao tratamento com ciclofosfamida. Foram verificados os tipos de células germinativas ausentes em cada um dos dias após tratamento avaliados, e as possíveis alterações morfológicas.

Além disso, análises morfológicas dos subtipos espermatogoniais foram realizadas através da MLAR, a fim de se verificar possíveis alterações morfológicas das espermatogônias, quando comparadas com os animais controle, em função do tratamento com ciclofosfamida.

- Análise semi-quantitativa:

A análise semi-quantitativa, em GMA, foi realizada em animais dos grupos B (controle) e G (150p.o.) (Tabela 1), submetidos ao experimento com dosagem única de ciclofosfamida. Com a utilização de um quadro de pontuação, foi possível determinar quais os tipos celulares estavam sendo afetados pela droga no momento da injeção (11 dias antes do sacrifício). Para isso, foi determinado, nos túbulos seminíferos, se as células germinativas do tipo espermatogônias A<sub>4</sub>, Intermediária-In e B, zigótenos, paquítenos e espermátides estavam presentes em (a) quantidades normais (mais que 20 células, para espermatócitos ou espermátides), (b) fortemente reduzidas (6 a 20 células), (c) praticamente ausentes (1 a 5 células) ou (d) ausentes (0 células).

- Número relativo de células germinativas por 100 nucléolos de células de Sertoli:

O número de cada subtipo espermatogonial (A<sub>ind</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In e B), espermatócitos, espermátides arredondadas e espermátides alongadas até a fase 12, presentes nos animais avaliados foi calculado, e normalizado por 100 nucléolos de células de Sertoli, uma vez que esse tipo celular apresenta-se em número invariável no epitélio seminífero de camundongos adultos. Foram contados os números de nucléolos de células de Sertoli e de núcleos dos subtipos espermatogoniais em aproximadamente 30 secções transversais de túbulos seminíferos, por animal.

Os números contados foram corrigidos pela fórmula de Abercrombie (Abercrombie, 1946) utilizando-se os diâmetros nucleares de cada tipo de célula germinativa, calculados a partir da média da medida de 10 núcleos, e o diâmetro nucleolar das células de Sertoli, calculado também a partir da média da medida de 10 nucléolos.

- Apoptoses espermatogoniais:

O número de apoptoses espermatogoniais foi calculado para os animais que receberam injeções de ciclofosfamida, em diferentes momentos da padronização de tratamento.

Inicialmente, contamos o número de espermatogônias apoptóticas (TUNEL positivas) presentes nos animais que receberam dosagem única de ciclofosfamida. Baseado nos dados de apoptose obtidos por Cai e colaboradores (1997) para ratos tratados com ciclofosfamida, decidimos realizar as análises nos dias 1, 2 e 3, após a administração da droga. Foram contadas espermatogônias TUNEL positivas em secções transversais de túbulos seminíferos, determinando-se os estádios do CES através da coloração de PAS. Foram contados aproximadamente 10 túbulos por estádio, calculando-se a porcentagem de túbulos com células TUNEL positivas, por estádio.

A partir dos dados obtidos no tratamento com dosagem única de ciclofosfamida, optamos por avaliar o índice apoptótico dos animais que receberam múltiplas dosagens, 3 dias após a última administração da droga. Foram contadas aproximadamente 30 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, registrando-se o número de espermatogônias por túbulo, e de espermatogônias TUNEL positivas por túbulo. O índice apoptótico foi calculado dividindo-se o número total de espermatogônias TUNEL positivas pelo número total de espermatogônias contadas.

- Número de colônias produzidas após o transplante:

Para as análises foram selecionadas lâminas obtidas a partir de testículos que sabidamente receberam uma maior quantidade de células no momento do transplante. Foram selecionados 10 testículos para cada grupo, para os receptores que receberam células dos animais jovem, adultos tratados com ciclofosfamida e criptorquídicos, e 7 testículos para o grupo que recebeu células de animais adultos normais.

Durante a coleta os testículos foram seccionados em quatro partes, dessa forma foram analisadas 4 secções transversais de testículos, por testículo selecionado. Nas análises, foram

contadas todas as secções transversais de túbulos seminíferos presentes em cada secção de testículo.

Os túbulos seminíferos foram classificados quanto à positividade para GCNA-1, e os túbulos positivos para GCNA-1 foram classificados quanto à positividade para GFP. Para se determinar a eficiência do transplante, a partir do número de colônias formadas pelas células doadoras, e compararmos os resultados obtidos nos diferentes grupos, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$(GFP_p \div NT) \times 100 \times (10^5 \div CI)$$

Onde: *GFP<sub>p</sub>* = número de túbulos GFP positivos

*NT* = número de túbulos contados

*CI* = número de células injetadas no momento do transplante

A partir das contagens e do cálculo foi possível obter o número total de colônias formadas nos animais receptores, a porcentagem de colônias geradas por recuperação das espermatogônias tronco endógenas, e a porcentagem de colônias formadas pelas células doadoras que colonizaram os túbulos seminíferos dos animais receptores.

### 3.9. Análise estatística

Os dados morfométricos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. Os grupos foram comparados usando teste ANOVA, seguido dos testes Fisher's LSD e Turkey's. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas no programa SPSS 18.0 (SPSS Inc. Chicago/USA).

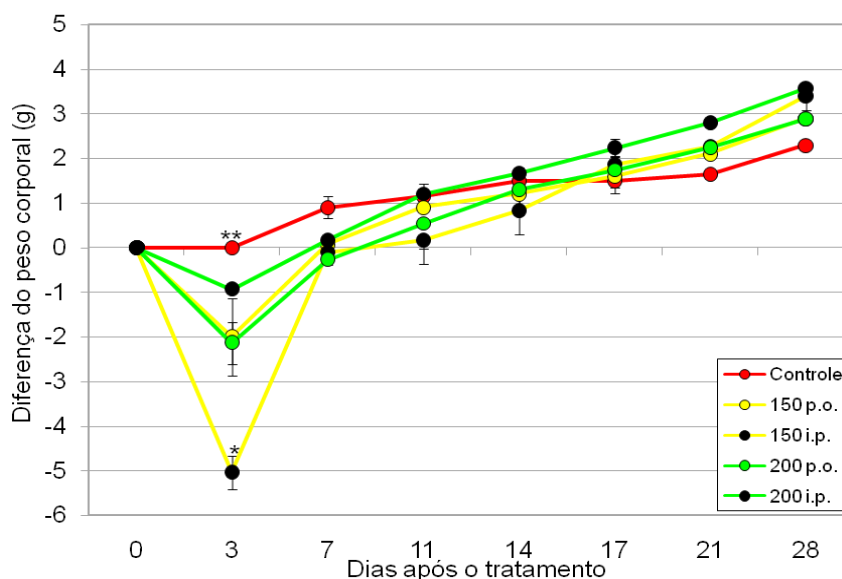


## 4. Resultados

### 4.1. Alterações causadas por uma única dose de ciclofosfamida

- Avaliação dos pesos corporais e testiculares:

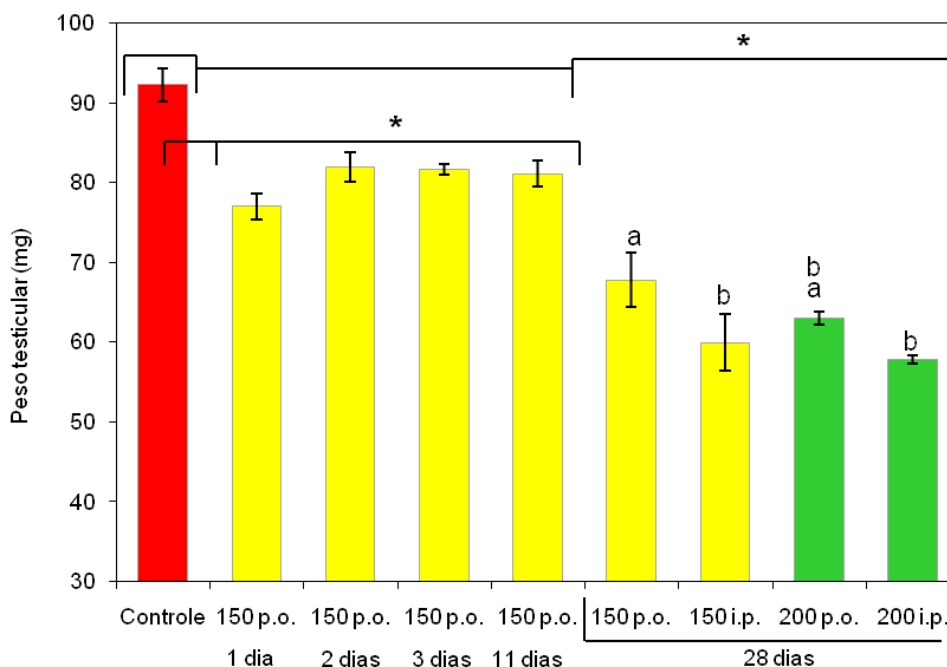
Os animais tratados apresentaram forte diminuição no seu peso corporal três dias após o tratamento. No entanto, os animais voltam a ganhar peso, alcançando a mesma proporção que os animais controle, 11 dias após a injeção (Figura 5).



**Figura 5** – Alterações no peso corporal dos camundongos tratados com dose única de ciclofosfamida. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal. (N=3)

No que diz respeito às medidas de peso testicular, animais analisados 28 dias após o tratamento apresentaram valores menores do que o valor mensurado para os animais controle (Figura 6). Pudemos ainda observar que a dose de 150mg/Kg afeta mais o peso testicular quando aplicada através de injeção intraperitoneal, do que por de administração oral.

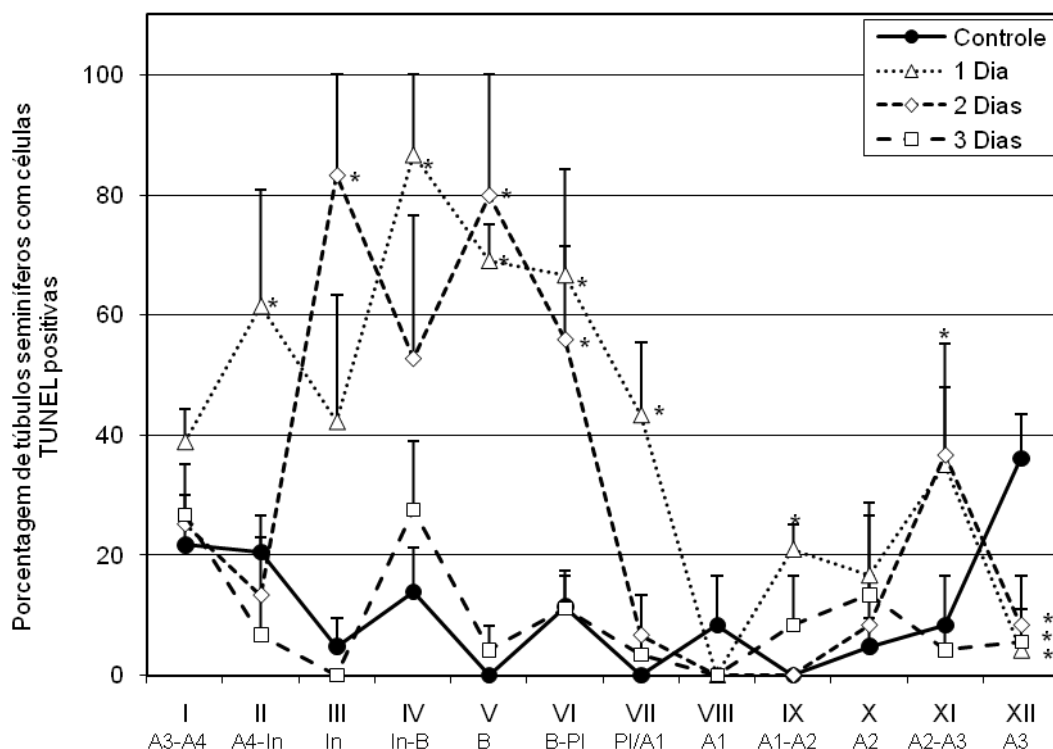
Embora as alterações mais drásticas nos pesos testiculares dos animais tratados tenham sido observadas 28 dias após a injeção da droga, a redução do peso testicular já começa a ser percebida 1 dia após o tratamento (Figura 6).



**Figura 6** – Peso testicular dos camundongos tratados com uma única dose de ciclofosfamida. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle, letras indicam diferença significativa entre os tratamentos, 28 dias após a injeção da droga ( $p < 0,05$ ). p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal. (N=3)

• Indução de apoptose e depleção das células germinativas:

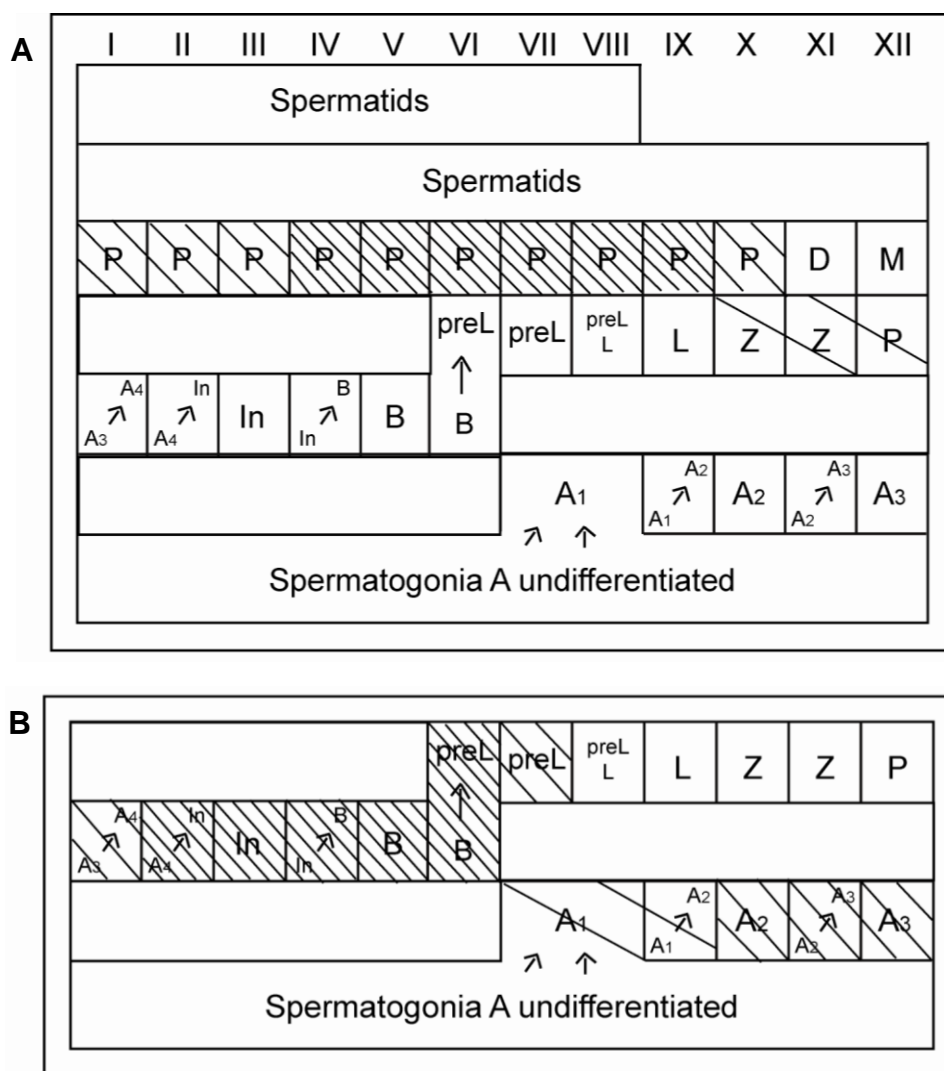
A contagem das células positivas para TUNEL indicou que a ciclofosfamida induziu o aumento da morte celular nos dias 1 e 2 após a administração da droga, e que após o terceiro dia o número de apoptoses retornou ao nível basal, com valores semelhantes aos dos animais controle (Figura 7). A quantificação de células apoptóticas por estádios sugere que as espermatogônias sejam mais sensíveis à droga no momento em que estão sofrendo divisões mitóticas. Os resultados observados no 1º dia após o tratamento mostram uma incidência maior de células positivas para TUNEL ocorrendo em estádios com divisão mitótica espermatogonial, quando comparadas com estádios antes e após a divisão (Figuras 2 e 8).






**Figura 7** – Porcentagem de túbulos seminíferos com células TUNEL positivas, por estágio do CES, ao 1º, 2º e 3º dias após a injeção de uma dose de ciclofosfamida (150mg/Kg p.o.). Valores expressos em média + erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa em relação aos animais controle ( $p < 0.05$ ). A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In e B, espermatogônias em diferenciação; PI, spermatócitos pré-leptótenos. (N=3)

Aos 11 dias após a injeção, a maioria dos túbulos apresentou ausência parcial, ou completa, dos espermatócitos em prófase meiótica (Figura 9B). As análises semi-quantitativas revelaram ausência quase completa de paquítenos nos estádios IV a VIII (Figuras 2 e 8A), e forte redução dos zigótenos nos estádios X e XI, e paquítenos iniciais nos estádios XII a III. Esses dados indicam que as espermatogônias do tipo A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>, In e B e os pré-leptótenos (Figura 8B) são parcialmente, ou totalmente, sensíveis à ciclofosfamida, confirmando assim os resultados fornecidos pelas análises de TUNEL em diferentes estádios (Figura 7).

As espermatogônias A indiferenciadas e os espermatócitos em fase mais avançada parecem não apresentar sensibilidade à droga (Figura 8B).



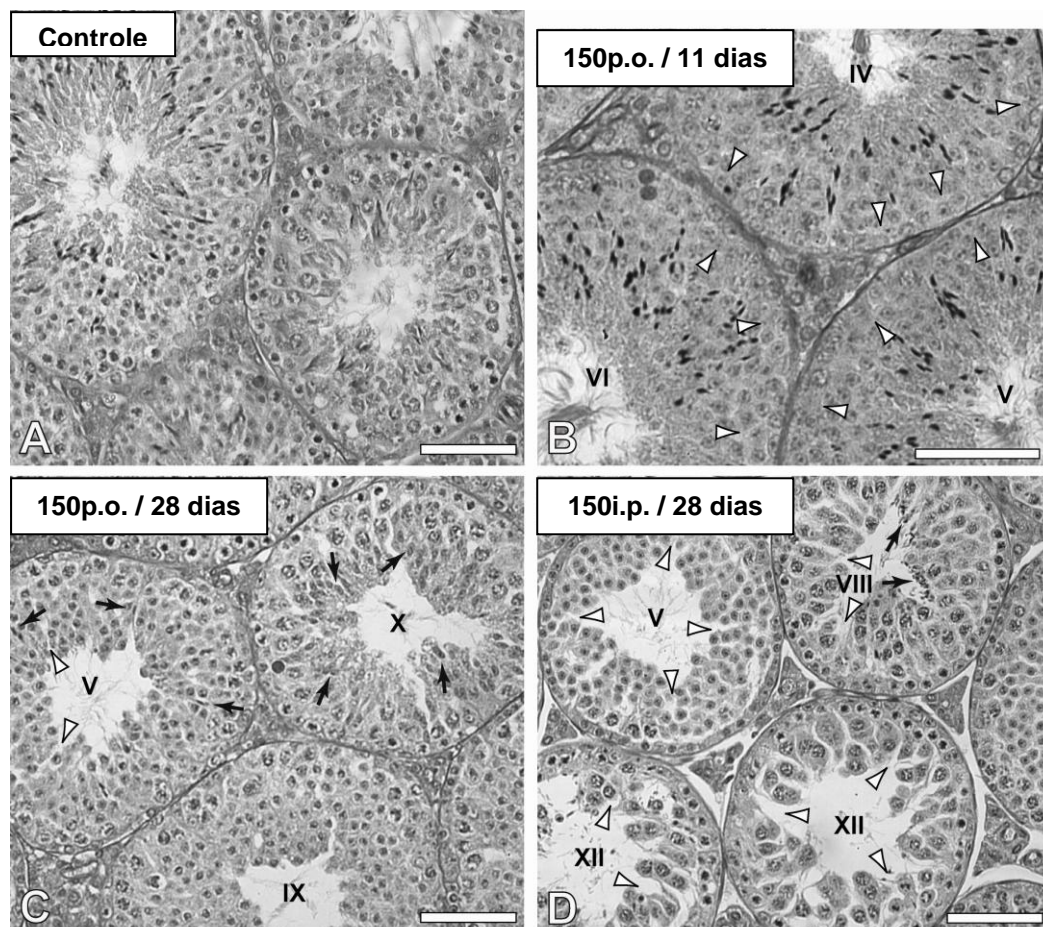
**Figura 8** – Células germinativas organizadas em doze estádios do CES. **A)** Células germinativas observadas 11 dias após uma injeção de cicfosfamida. **B)** Células germinativas afetadas pela cicfosfamida no momento da injeção. Quantidade de células foi cassificada em  Ausentes;  Praticamente ausentes; ou  Fortemente reduzidas. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In e B, espermatogônias em diferenciação; preL, pre-leptótenos; L, leptótenos; Z, zigótenos; P, paquítenos; D, diplótenos; M!, divisões meióticas I e II.

• Avaliações realizadas aos 28 dias após o tratamento:

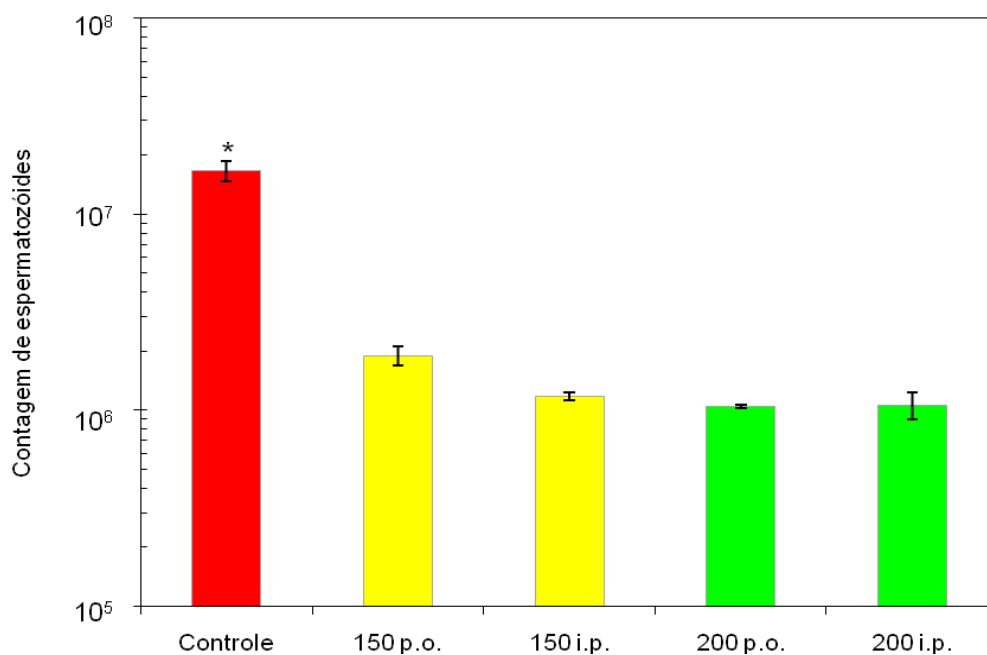
As análises histológicas do epitélio seminífero 28 após a injeção de 150mg/Kg p.o. (Figura 9C) mostraram que as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides se regeneraram relativamente bem, a partir das espermatogônias-tronco sobreviventes. Apesar de a maior parte das espermátides alongadas estar ausente (estádios II-VIII; Figuras 9B e 2), ainda foi possível observar uma quantidade aparentemente normal de espermátides alongadas em estágios iniciais de desenvolvimento nos estádios IX-XII. Em contraste, para os tratamentos utilizando 150mg/Kg i.p. e

200mg/Kg p.o. e i.p., a maior parte dos túbulos nos estádios IX-XII apresentam forte redução das espermatídes alongada (Figura 9D).

As contagens de espermatozóides testiculares realizadas aos 28 dias após a administração de ciclofosfamida (Figura 10) mostraram uma queda no número de espermatozóides. Esses dados são consistentes com a redução de espermatídes alongadas nos estádios XII-VIII, observada nas análises histológicas (Figuras 9C e D). Não houve diferença significativa entre a queda provocada pelos diferentes tratamentos.



**Figure 9** – Secções transversais de túbulos seminíferos de camundongos que receberam injeção de salina (A), e uma injeção oral de ciclofosfamida, na dose de 150mg/Kg, 11 dias após a injeção (B), e 28 dias após a injeção (C, D). Cabeças de seta, ausência de espermatócitos (B) ou espermatídes alongadas (C,D); Setas, presença de espermatídes alongadas; p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal. Estádios do epitélio seminífero estão representados no lúmen dos túbulos, por números romanos. Barras equivalem a 70  $\mu$ m.

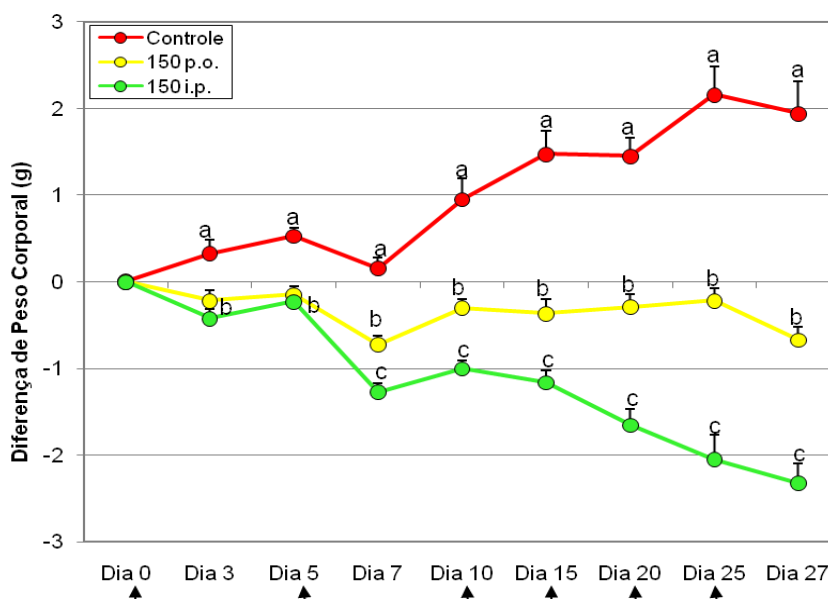


**Figura 10** – Contagem de espermatozoides testiculares nos camundongos tratados com dose única de ciclofosfamida e sacrificados 28 dias após a dose. Valores expressos em média ± erro padrão. p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal. (N=3)

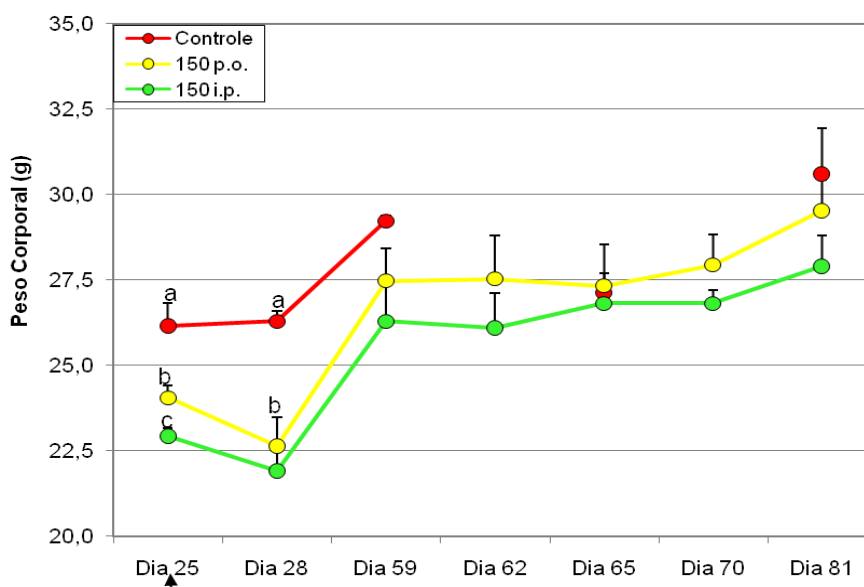
#### 4.2. Alterações causadas por múltiplas doses de ciclofosfamida

- Alterações no peso corporal durante e após o tratamento:

Os animais tratados perderam peso corporal ao longo do tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida (Figura 11). Animais tratados através de injeções intraperitoneais tiveram uma redução no peso corporal maior do que animais tratados por via oral. Ao fim do tratamento os animais voltam a ganhar peso corporal (Figura 12), alcançando o peso corporal dos animais controle, o que demonstra que não há intoxicação sistêmica, acumulada, em decorrência do tratamento.



**Figura 11** – Diferença do peso corporal dos camundongos ao longo do tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida, a cada 5 dias. Valores expressos em média + erro padrão. Letras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). As setas indicam os dias de aplicação da droga. p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal. (N=9 para grupo controle, e N=28 para grupos tratados)



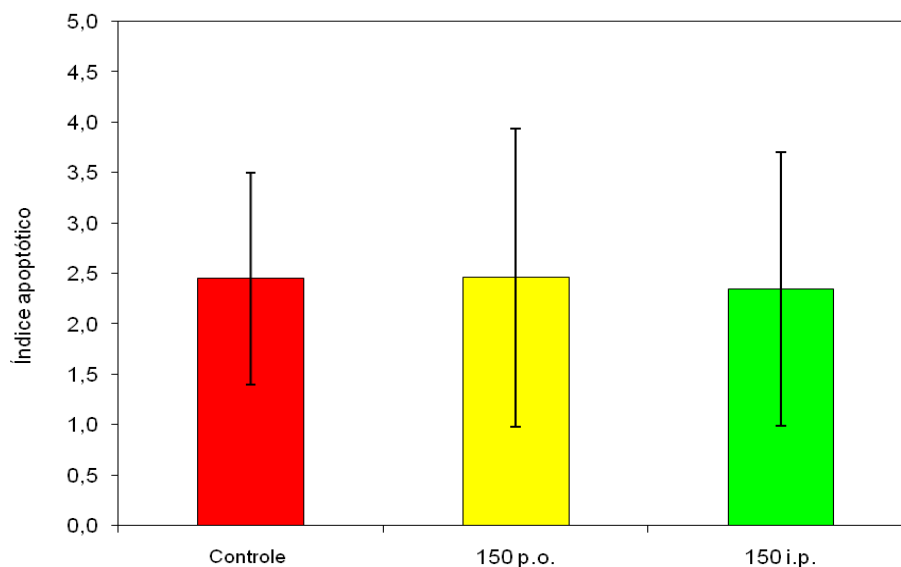
**Figura 12** – Peso corporal dos camundongos tratados com múltiplas doses de ciclofosfamida, a cada 5 dias, após o fim do tratamento (aos 25 dias como mostra a seta), em cada um dos dias de sacrifício escolhidos. Valores expressos em média + erro padrão. Letras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal. (N=9 para grupo controle, e N=28 para grupos tratados)

• Quantificação de morte celular:

Os resultados obtidos nas análises de TUNEL dos animais que receberam uma dose de ciclofosfamida (150mg/Kg p.o.) demonstraram que aos 3 dias após a administração da droga o número de células apoptóticas volta a ser igual ao encontrado para os animais controle. A partir deste

dados, decidimos investigar se o tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida resultaria no aumento do período em que as células estariam sofrendo apoptose.

O cálculo do índice apoptótico espermatogonial, 3 dias após o fim do tratamento, (Figura 13) demonstrou que não há alteração no período de indução da morte celular, após das múltiplas doses, uma vez que os valores encontrados para os animais tratados foram os mesmos que o dos animais do grupo controle.

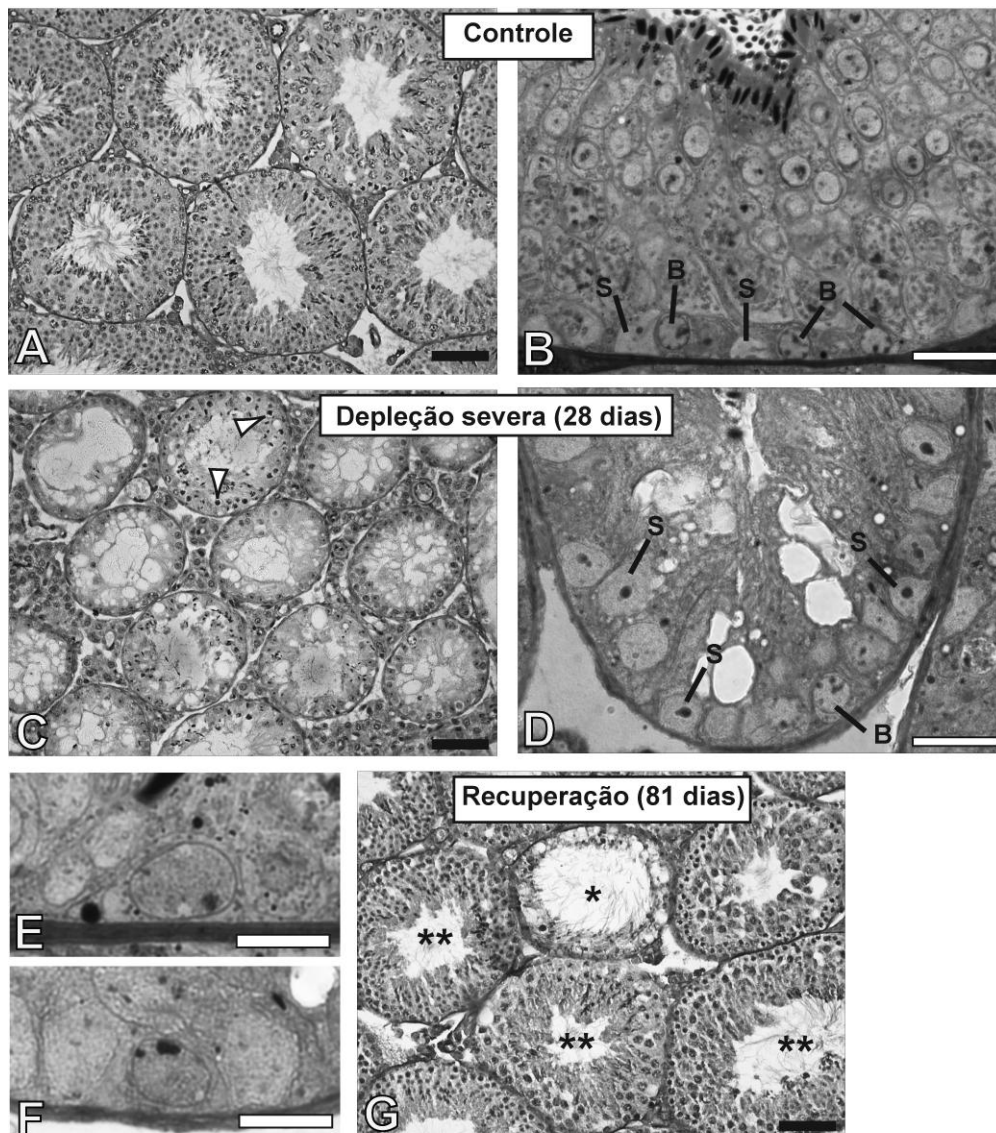


**Figura 13** – Índice apoptótico de espermatogônias, em camundongos tratados com seis doses de ciclofosfamida, 3 dias após a última dose administrada. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal. (N=3)

• Análises histológicas e de número celular:

As análises histológicas (Figura 14), realizadas 28 dias após a primeira injeção, mostraram um dano severo no epitélio seminífero dos animais tratados (Figura 14C), quando comparados com os animais controle (Figura 14A). Observamos, em todos os tratamentos, atrofia tubular e formação de vacúolos nas regiões do epitélio seminífero em que as células germinativas estavam ausentes. Apesar da forte depleção, a presença de espermatócitos ainda pode ser detectada em algumas regiões do epitélio. Avaliações em maior aumento (Figuras 14D) demonstraram que espermatogônias em diferenciação ainda estão presentes, particularmente nos animais que receberam 5 administrações por via oral. Espermatogônias indiferenciadas foram observadas em todos os animais tratados (Figura 14F), com morfologia semelhante à dos animais controle (Figura 14E).

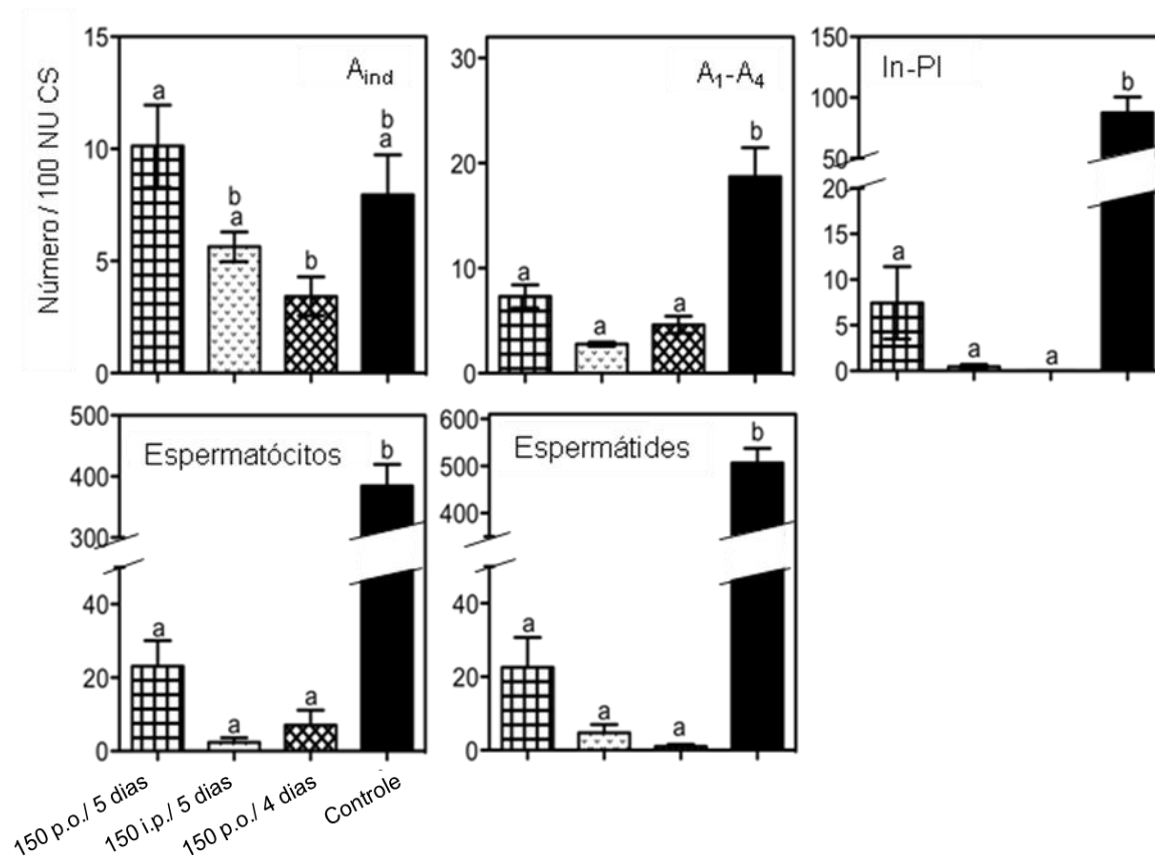




**Figura 14** – Secções transversais de túbulos seminíferos de camundongos que receberam injeção de salina (A), e em maior aumento (B) mostrando células de Sertoli (S) e espermatogônias em diferenciação do tipo B (B). (C) túbulos seminíferos de camundongos que receberam múltiplas doses de ciclofosfamida (150mg/Kg p.o.) com intervalos de 5 injeções, 28 dias após a primeira injeção, apresentando espermatócitos ainda presentes no epitélio seminífero (cabeça de seta). Em maior aumento (D) pode-se observar células de Sertoli e espermatogônias do tipo B. Podem ser observadas ainda, espermatogônias do tipo A indiferenciadas em animais do grupo controle (E) e animais tratados (F). Em (G) túbulos seminíferos de animais tratados 81 dias após a primeira injeção, mostrando recuperação na maior parte dos túbulos (\*\*), porém alguns túbulos ainda se mostram danificados (\*). Barras pretas equivalem a 70  $\mu$ m, e barras brancas equivalem a 20  $\mu$ m (B, D) e 10  $\mu$ m (E,F).

As contagens de células germinativas mostraram que, aos 28 dias, todos os tratamentos resultaram em um menor número de espermatogônias em diferenciação, espermatócitos e espermátides (Figura 15). As análises de número de espermatogônias após 25 dias de tratamento com ciclofosfamida por administração oral mostraram que algumas espermatogônias intermediárias e

B ainda estão presentes. No entanto, essas células praticamente não foram observadas em animais tratados com injeções i.p. ou por p.o., durante 24 dias. Em relação ao número de espermatócitos e espermatídes, houve uma queda nos valores apresentados por animais tratados para aproximadamente 6% do número de células observado nos animais controle, para animais tratados por p.o., a cada 5 dias, e 2% para os demais grupos tratados.



**Figura 15** – Número de espermatogônias do tipo A indiferenciada ( $A_{ind}$ ), espermatogônias em diferenciação  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$  ( $A_1-A_4$ ), espermatogônias In, B e spermatócitos pre-leptótenos (In-PI), espermatócitos e espermatídes, por 100 núcleos (NU) de células de Sertoli (CS), presentes em camundongos tratados com múltiplas doses de ciclofosfamida, ou animais controle. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal.

No que diz respeito às espermatogônias do tipo A indiferenciadas, ao contrário da grande queda observada para o número de espermatogônias em diferenciação, apenas uma leve queda foi observada no número de espermatogônias  $A_{ind}$  (Figura 15). A maior diferença foi produzida em relação a ambos os grupos tratados com 150mg/Kg p.o., sugerindo que o aumento no número de doses recebidas pode aumentar a janela de células que está sendo afetada pela ciclofosfamida.

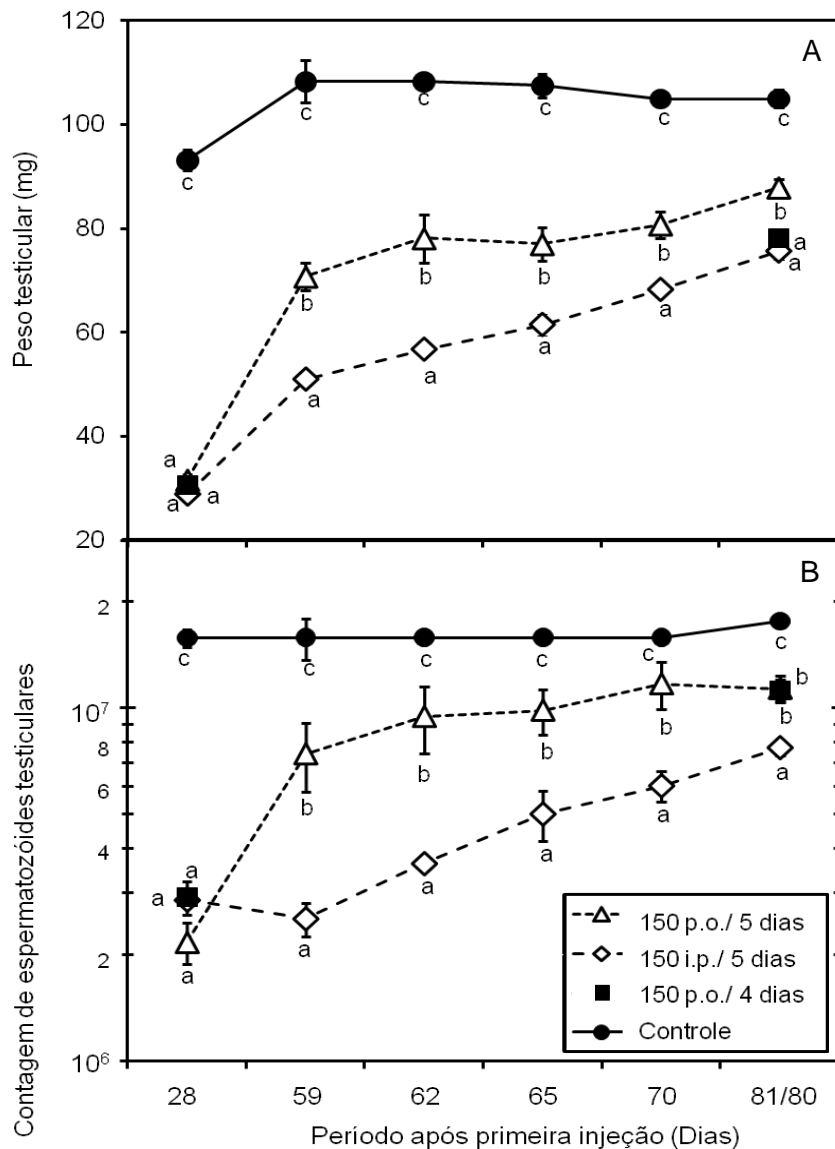
### 4.3. Recuperação do epitélio seminífero ao fim do tratamento

- Análises histológicas:

As análises morfológicas, realizadas 56 dias após a última dose (80/81 dias após a primeira dose), revelaram que o epitélio seminífero dos animais tratados se recupera relativamente bem (Figura 14G). O diâmetro dos túbulos seminíferos voltou a ser semelhante ao dos animais controle (Figura 14A), e não foram observados vacúolos, como os presentes aos 28 dias. Embora raros, túbulos seminíferos danificados ainda podem ser observados nos animais tratados.

- Análise da recuperação da função testicular:

A fim de verificar a funcionalidade das espermatogônias-tronco presentes ao fim do tratamento, nós analisamos a recuperação da espermatogênese nos animais tratados, em diferentes períodos após a primeira injeção. Ambos os parâmetros analisados, peso testicular (Figura 16A) e contagem de espermatozoides testiculares (Figura 16B), demonstram que há uma recuperação da função testicular. O tratamento utilizando injeções intraperitoneais apresentou a menor recuperação dentre os grupos, e é possível que o tratamento via i.p. tenha causado danos não só ao funcionamento das espermatogônias-trono, mas aos componentes somáticos do epitélio seminífero.



**Figura 16 – A)** Recuperação do peso testicular dos camundongos tratados com múltiplas doses de ciclofosfamida. **B)** Recuperação da produção de espermatozoides, após o tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). p.o., por via oral; i.p., por via intraperitoneal.

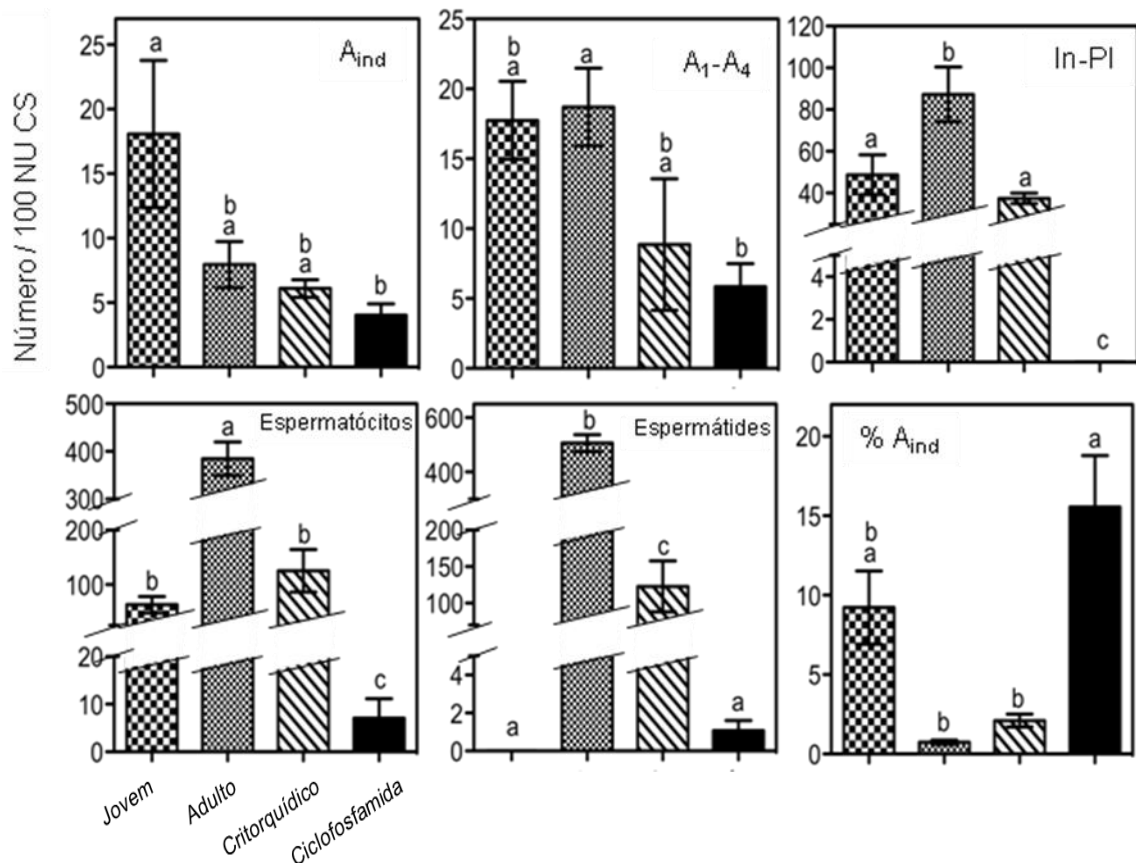
#### 4.4. Capacidade funcional das espermatogônias-tronco após transplante

- Número de células germinativas presente nos animais doadores:

Ao analisar o número de espermatogônias de cada animal doador (Figura 17), observamos que o número de espermatogônias A indiferenciadas é menor em animais tratados com ciclofosfamida, quando comparado com animais jovens. No que diz respeito às espermatogônias A em diferenciação, novamente observamos que o número obtido para animais tratados com ciclofosfamida é menor do que para animais jovens, e também menor do que em animais adultos. Animais criptorquídicos e animais adultos apresentam um número de espermatogônias  $A_{ind}$  e A em diferenciação semelhante

ao observado para animais jovens. Em relação aos demais tipos celulares, os dados morfométricos revelam que, além da queda no número de espermatogônias, houve uma ampla depleção de espermatócitos e espermatídes em animais tratados com ciclofosfamida, principalmente quando comparados com os outros grupos. Por apresentarem um número baixo de todos os tipos celulares mais avançados, os animais tratados com ciclofosfamida foram ainda os que apresentarem uma maior porcentagem de espermatogônias do tipo A indiferenciadas.

Animais criptorquídicos apresentaram um número de espermatogônias In e B, e de espermatócitos, semelhante ao valor observado para animais jovens, no entanto, apresentaram um número maior de espermatídes. Animais adultos apresentaram um número muito alto de todos os tipos celulares avaliados.



**Figura 17** – Número de espermatogônias do tipo A indiferenciada ( $A_{ind}$ ), espermatogônias em diferenciação  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$  ( $A_1-A_4$ ), espermatogônias In, B e spermatócitos pre-leptótenos (In-PI), espermatócitos e espermatídes, por 100 núcleos (NU) de células de Sertoli (CS), presentes nos doadores. Porcentagem de espermatogônias A indiferenciadas, por total de células, presentes em cada camundongo doador. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

- Características das suspensões celulares:

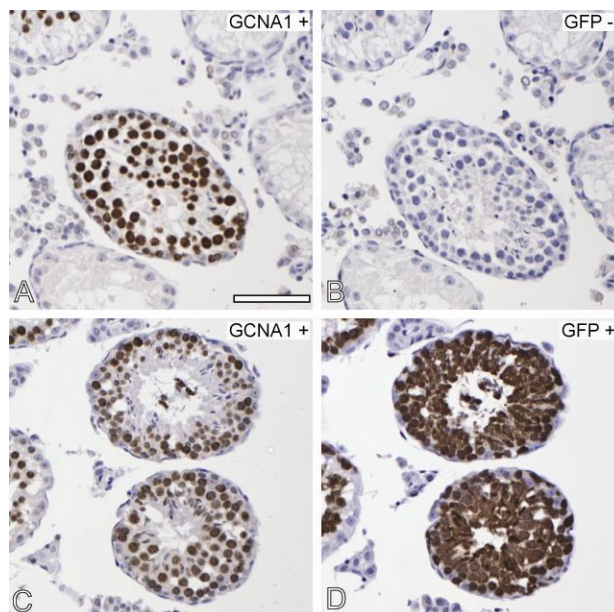
As contagens celulares realizadas no momento da obtenção das suspensões, revelaram que animais criptorquídicos e animais tratados com ciclofosfamida apresentaram peso testicular médio e o número de células obtido na suspensão celular semelhantes entre si (Tabela 6). Camundongos jovens, por sua vez, forneceram um número maior de células por testículo do que os grupos de animais tratados. Como esperado, o peso testicular médio e o número de células obtidas na suspensão celular dos animais adultos, não tratados, foram maiores que os dos outros animais, devido ao fato de todas as células germinativas estarem presentes nesses animais. Vale ressaltar que o protocolo de obtenção da suspensão celular foi o mesmo para todos os animais, de forma que o procedimento não interferiu no resultado do número de células por testículo obtido.

**Tabela 6** – Peso testicular dos camundongos doadores, número de testículos utilizados e número de células obtido a partir dos animais doadores no momento da obtenção da suspensão celular. O peso testicular foi obtido para todos os testículos juntos e dividido pelo número de testículos coletados. Para os grupos jovens, criptorquídicos e tratados com ciclofosfamida, foram realizados 2 experimentos. Exp, experimento.

Doador	Peso Testicular (mg)	Número de Testículos	Células / Testículo (x10 <sup>6</sup> )
Adulto	104,0	10	21,2
Jovem	11,5	10 (1º Exp) - 6 (2º Exp)	1,8 (1º Exp) – 5,0 (2º Exp)
Adulto/Criptorquídico	27,1	6 (1º Exp) - 13 (2º Exp)	1,0 (1º Exp) - 1,4 (2º Exp)
Adulto/Ciclofosfamida	29,9	8 (1º Exp) - 10 (2º Exp)	1,0 (1º Exp) - 1,6 (2º Exp)

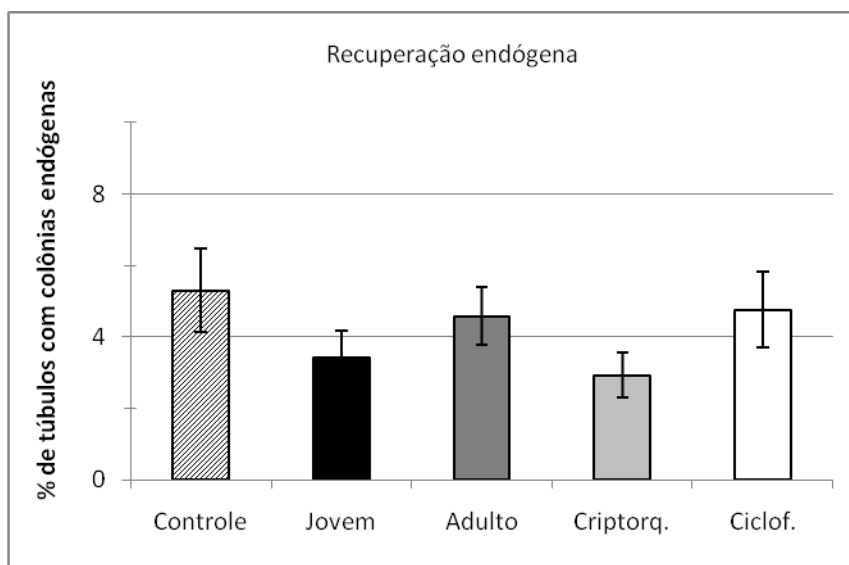
- Análises morfométricas dos camundongos receptores, após o transplante:

Após a coloração com imunoistoquímica, foi possível reconhecer, dentre os túbulos seminíferos que apresentavam diferenciação celular (positivos para GCNA1 - Figura 18A e C), quais eram consequência de recuperação endógena da espermatogênese (negativos para GFP - Figura 18B) e quais eram resultado da diferenciação das espermatogônias transplantadas (positivos para GFP - Figura 18D).



**Figura 18** – Imunohistoquímica nos túbulos seminíferos dos camundongos irradiados, após o transplante. Fotomicrografia **A** mostra células GCNA1 positivas (+), indicando diferenciação das células germinativas originada por recuperação endógena da espermatogênese (GFP negativas (-) em **B**). Em **C** a diferenciação também pode ser observada, porém originada de células doadoras, uma vez que **D** mostra células que são GFP positivas. Barra de aumento equivale a 250 $\mu$ m.

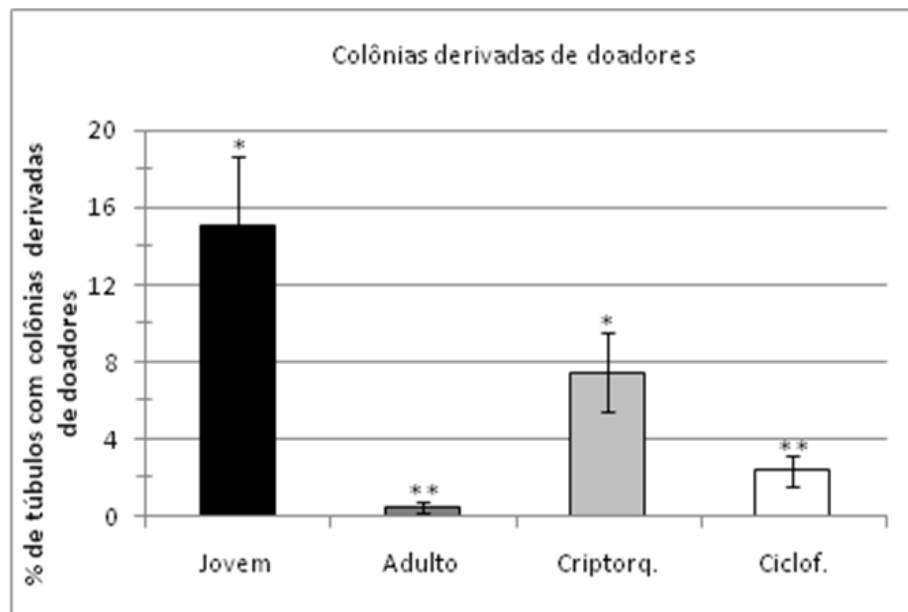
As análises morfológicas realizadas nos testículos dos animais receptores demonstram que, 8 semanas após o transplante, todos os grupos apresentaram recuperação da espermatogênese endógena, em igual número ao dos animais controle (animais irradiados que não receberam transplante), e que aproximadamente 4% dos túbulos seminíferos apresentaram recuperação da espermatogênese endógena (Figura 19).



**Figura 19** – Porcentagem de túbulos seminíferos dos camundongos receptores que apresentaram colônias positivas para recuperação endógena da espermatogênese. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Criptorq., criptorquídicos; Ciclof., tratados com ciclofosfamida.

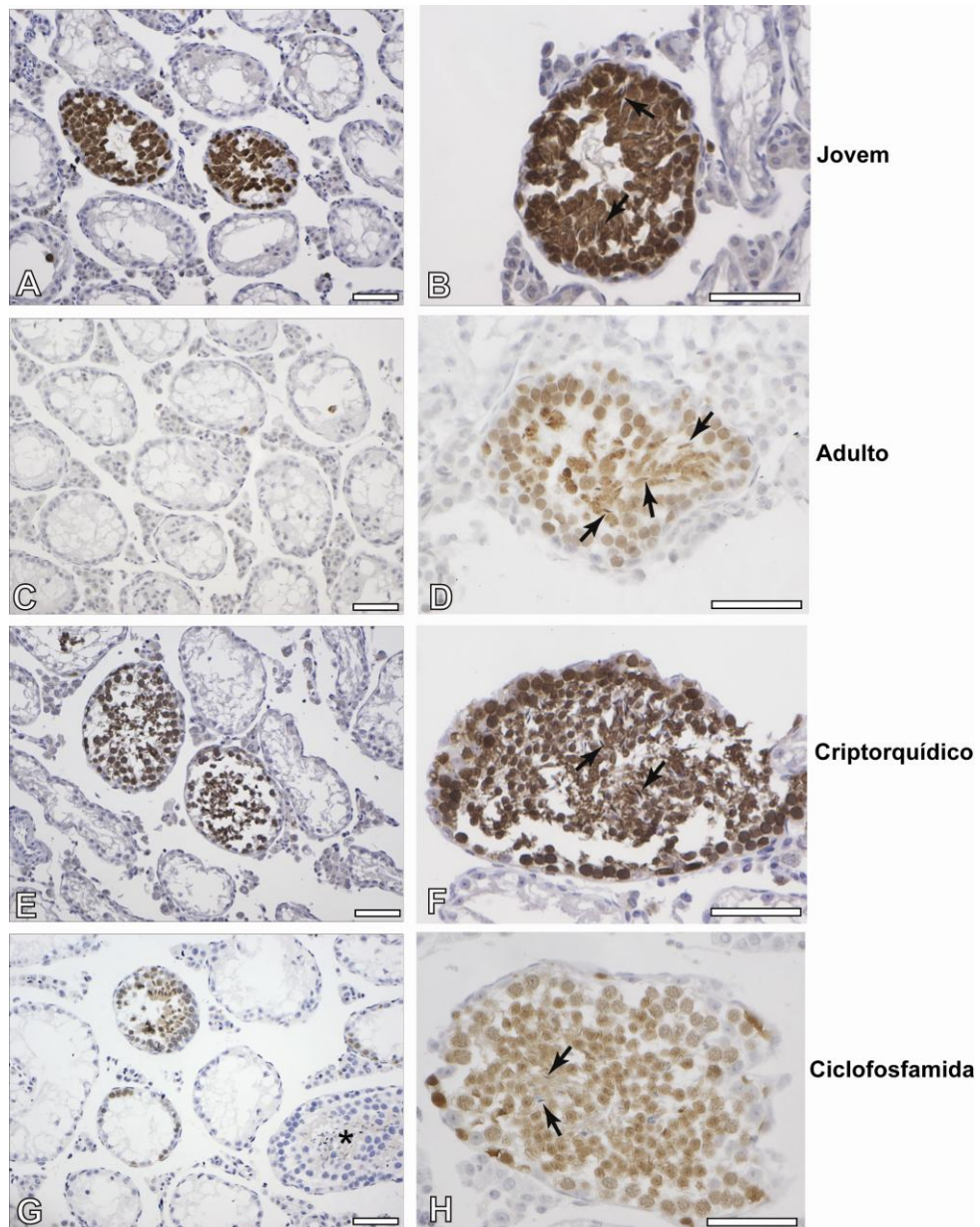
Em relação aos túbulos seminíferos com células germinativas de animais doadores, os resultados demonstraram que as células de animais jovens apresentaram a maior porcentagem de colonização (Figuras 20), enquanto animais adultos, não tratados, resultaram na menor porcentagem de colônias produzidas. Animais criptorquídicos produziram um número de colônias igual ao observado para animais jovens. Finalmente, considerando a porcentagem de colônias produzidas pelos animais tratados com ciclofosfamida (Figuras 20), essa foi menor do que o resultado observado para animais jovens, e animais criptorquídicos, sugerindo que o tratamento com o quimioterápico resultou em dano das células germinativas transplantadas.

Finalmente, apesar das diferenças na quantidade de túbulos clonizados, foi possível perceber que todas as células de doadores produziram, 8 semanas após o transplante, espermátides alongadas (Figura 21), e que não houve diferença na qualidade do epitélio seminífero produzido a partir de células doadoras entre nenhum dos grupos de doadores.



**Figura 20** – Porcentagem de túbulos seminíferos dos camundongos receptores que apresentaram colônias derivadas das células doadoras. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Criptorq., criptorquídicos; Ciclof., tratados com ciclofosfamida.





**Figura 21** – Seções transversais de túbulos seminíferos de camundongos que receberam suspensões celulares de camundongos jovens (A,B), adultos normais (C,D), adultos criptorquídicos (E,F) e adultos tratados com ciclofosfamida (G,H), mostrando um túbulo com recuperação da espermatogênese endógena (\*). Setas indicam espermátides alongadas produzidas a partir de células doadoras (GFP positivas). Barras indicam 70 μm.

## 5. Discussão

No presente estudo nós desenvolvemos um regime de tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida capaz de eliminar as células mais diferenciadas dos testículos, mantendo a população de espermatogônias do tipo A indiferenciadas. Nós encontramos um balanço entre doses, vias de administração e intervalos entre doses, ideais para eliminar desde espermatogônias em diferenciação até espermátides mais avançadas, sendo menos tóxico para o animal, e ainda permitindo a sobrevivência de um número considerável de células-tronco espermatogoniais, e a recuperação da espermatogênese *in situ*, a partir das células sobreviventes. O regime de tratamento utilizado reduziu o número de células diferenciadas para 1% dos valores observados para animais do grupo controle, porém deixou aproximadamente 50% de espermatogônias do tipo A<sub>ind</sub>. O enriquecimento da população de espermatogônias-tronco, através do tratamento com ciclofosfamida, poderia ser utilizado como um passo inicial de purificação celular, para uso em estudos moleculares que objetivam elucidar os efeitos de ciclofosfamida sobre essas células.

Esses resultados são consistentes com uma série de outros estudos presentes na literatura que demonstram, em roedores, a sensibilidade das espermatogônias em diferenciação a tratamentos com ciclofosfamida, porém uma relativa resistência das células-tronco a uma variedade de regimes de tratamento (Lu & Meistrich, 1979; Karashima et al., 1988; Velez et al., 1989, Russel & Russel, 1991; Cai et al., 1997). Isto é observado em contraste com outras drogas quimioterápicas, tais como bussulfan, doxorubicina e procarbazina, que efetivamente eliminam as espermatogônias-tronco, assim como as espermatogônias em diferenciação, do epitélio seminífero (Meistrich et al., 1982; Bucci & Meistrich, 1987; Brinster & Avarbock, 1994).

Ao final do tratamento, a presença de espermatogônias A<sub>ind</sub> aparentemente saudáveis permitiu a observação de subsequente recuperação da espermatogênese nos animais tratados. Já aos 45 dias após a última injeção, antes que as espermatogônias A<sub>is</sub> tivessem tempo de sofrer auto-renovação e

ainda produzir espermatídes avançadas, a quantidade de espermatozóides testiculares observada nos animais tratados foi de aproximadamente 63% dos resultados apresentados pelo grupo controle.

Apesar da sobrevivência das espermatogônias-tronco, e da recuperação da espermatogênese *in situ*, essas células parecem apresentar uma perda de função espermatogênica quando manipuladas para transplante. Apesar de animais tratados com ciclofosfamida terem apresentado as maiores concentrações de células  $A_{ind}$  como porcentagem de células germinativas totais, a habilidade destas células de produzirem colônias após o transplante foi de apenas 16% dos valores apresentados para animais jovens, e 32% dos valores apresentados para animais criptorquídicos. Em relação aos animais pre-púberes, é difícil comparar, quantitativamente, os resultados apresentados por estes doadores com resultados observados em animais tratados ciclofosfamida, uma vez que o número de células obtidas por mg de testículo foi muito maior para animais jovens. Isso pode ter ocorrido porque as células de Sertoli nestes animais são ainda imaturas, e não estabeleceram junções oclusivas, facilitando a recuperação destas células nas suspensões celulares. A presença de células de Sertoli imaturas nas suspensões celulares transplantadas pode ter colaborado para o sucesso de colonização das células de doadores, uma vez que as células de Sertoli podem ter funcionado como nichos adicionais para a recuperação da espermatogênese nos animais receptores (Kanatsu-Shinohara et al., 2005; Zhang et al, 2009), embora nós não tenhamos observado células de Sertoli positivas para GFP nos camundongos receptores.

É possível estabelecer um paralelo entre animais criptorquídicos e animais tratados com ciclofosfamida, uma vez que esses doadores parecem ser semelhantes em vários aspectos. Os pesos testiculares e o número de células obtidas por testículos foram os mesmos observados para ambos os grupos, e o número de espermatogônias  $A_{ind}$  por células de Sertoli também foram semelhantes. Como ambos os modelos são provenientes de camundongos adultos, os tipos de células somáticas, e a estrutura do epitélio seminífero deveriam ser basicamente os mesmos. Ainda assim, embora a porcentagem de espermatogônias  $A_{ind}$  entre as células germinativas tenha sido aproximadamente 7 vezes maior nos animais tratados com ciclofosfamida, a colonização gerada por células de animais tratados com ciclofosfamida foi muito menor do que a colonização gerada por células de animais criptorquídicos. Embora a digestão com colagenase tenha removido a maioria das células intersticiais, e tenha resultado na perda de muitas células de Sertoli durante a digestão dos túbulos seminíferos (Mesitrich et al., 1973), é provável que algumas células ainda estejam presentes

na suspensão celular. Mesmo que todas as células de Sertoli tenham sido recuperadas na suspensão, a concentração de espermatogônias  $A_{ind}$  ainda seria 2,6 vezes maior nas suspensões celulares obtidas a partir de testículos de camundongos tratados com ciclofosfamida, e dessa forma uma colonização 2,6 vezes maior era esperada para esses animais. Assim, a diferença na eficiência de colonização sugere que as espermatogônias-tronco de animais tratados com ciclofosfamida apresentem um dano.

É de comum acordo que as espermatogônias-tronco estão contidas na população celular conhecida como espermatogônias  $A_{ind}$ . Existem relatos na literatura de que espermatogônias positivas para c-kit sejam capazes de colonizar testículos receptores (Barroca et al., 2008), sugerindo que essas células possam ser espermatogônias em diferenciação do tipo A. Se isso fosse verdade, então o número reduzido destas células em animais tratados com ciclofosfamida poderia ter colaborado para uma eficiência de colonização baixa, resultante das células destes animais. Porém, a expressão de c-kit começa a ser detectada em células  $A_{al}$  em estágio tardio de diferenciação (Nakagawa et al., 2010). Dessa forma, a habilidade de colonização das células positivas para c-kit é mais provavelmente exercida por células do tipo  $A_{al}$ , que pertencem às espermatogônias indiferenciadas, ou possivelmente por espermatogônia do tipo  $A_1$  em fase inicial de diferenciação. No entanto o número de espermatogônias  $A_1$  não está reduzido nos animais tratados (dados não mostrados), e a baixa habilidade de colonização não pode ser explicada pela ausência de espermatogônias em diferenciação.

O método histológico empregado, microscopia de luz de alta resolução, permite a identificação de espermatogônias  $A_{ind}$ , porém não mostra o tamanho das correntes espermatogoniais, ou fornece outros tipos de marcadores. A população de espermatogônias que contribui para o funcionamento normal da espermatogênese está contida dentro da sub-população celular conhecida como  $A_{is}$ , no entanto espermatogônias do tipo  $A_{pr}$  e  $A_{al}$  ocasionalmente contribuem para a população de células-tronco, através da fragmentação das pontes intercitoplasmáticas (Nakagawa et al., 2010). Essas células são consideradas células-tronco potenciais, e contribuem para a recuperação da espermatogênese após uma grande depleção celular, como a que ocorre após o tratamento com o agente quimioterápico bussulfan, ou após transplante de espermatogônias (Nakagawa et al., 2007). Embora nós não tenhamos determinado a distribuição de  $A_{is}$ ,  $A_{pr}$ , e  $A_{al}$  dentro das espermatogônias  $A_{ind}$ , nós podemos concluir que a porcentagem de células-tronco propriamente ditas ( $A_{is}$ ) deveria ser

consideravelmente alta nos testículos de animais tratados com ciclofosfamida. A presença de espermatogônias  $A_{pr}$  e  $A_{al}$ , que constituem a maior parte das células  $A_{ind}$ , aos 4 dias após a última administração de ciclofosfamida, indica que as células progenitoras, células-tronco, tenham sobrevivido às 6 injeções de ciclofosfamida, e dessa forma devem ter sobrevivido à sétima administração.

A baixa eficiência de colonização, quando comparados com animais criptorquídicos, com certeza reflete diferenças na qualidade das espermatogônias  $A_{ind}$  desses dois grupos. Estudos que permitirem a caracterização do tamanho dos clones celulares, e a observação dos marcadores de diferenciação espermatogoniais na população de  $A_{ind}$  sobrevivente, poderiam esclarecer as razões de porque há diferenças nas espermatogônias-tronco de animais criptorquídicos e daqueles tratados com ciclofosfamida. É importante destacar que os nichos que abrigam *in situ* as espermatogônias-tronco de animais criptorquídicos e de animais tratados com ciclofosfamida podem ser muito diferentes. Isso faz com que as espermatogônias, mesmo tendo sido transplantadas para ambientes semelhantes (testículos de camundongos irradiados), se comportem de forma completamente diferentes, explicando assim as diferenças na eficiência de colonização.

Também é possível que tenha havido morte celular de pelo menos parte das espermatogônias-tronco, mas que *in situ* a morte celular tenha sido compensada por fragmentação dos clones celulares, e que tenha ocorrido aumento dos ciclos de auto-renovação das células-tronco (de Rooij, 1988). Apesar da morte de parte das espermatogônias-tronco, a recuperação *in situ* deve ter ocorrido devido ao aumento nas divisões celulares de espermatogônias  $A_{al}$ , e à redução da apoptose de espermatogônias  $A$  em diferenciação (de Rooij, 2001). Assim, o transplante de células germinativas se torna um ensaio direto da quantificação de espermatogônias-tronco, pois a recuperação endógena da espermatogênese não é sensível a perdas celulares moderadas no número de células-tronco. Dessa forma, a eficiência de colonização maior em animais criptorquídicos pode refletir a presença de mais células-tronco saudáveis do que em animais tratados com ciclofosfamida.

Alternativamente, é possível que um número maior de células-tronco saudáveis esteja presente nos testículos de animais tratado com ciclofosfamida, no entanto elas se recuperam melhor *in situ*, e apresentam algum dano à habilidade de colonizarem testículos dos animais receptores. Nosso grupo mostrou que a habilidade de colonização e diferenciação de células de doadores imaturos pode ser melhorada após a supressão de testosterona nos animais receptores, antes e depois do transplante

de células germinativas (Wang et al., 2010). Assim, talvez seja interessante avaliar se a supressão hormonal poderia melhorar a atividade funcional das espermatogônias submetidas a ciclofosfamida, nos testículos de animais receptores.

Em resumo, as espermatogônias-tronco de camundongos sobrevivem a múltiplas doses de ciclofosfamida, e uma recuperação considerável da espermatogênese endógena é observada após o tratamento. No entanto, ainda há evidências de perda de espermatogônias-tronco, ou de um dano residual destas células quando elas são isoladas para transplante, porém o motivo pelo qual isso ocorreria ainda tem que ser esclarecido. A observação da perda e dano celular em camundongos tratados com ciclofosfamida pode fornecer métodos para melhor compreender a grande sensibilidade dos testículos de pacientes à prologada azoospermia após o tratamento com ciclofosfamida (Hsu et al., 1979; Fukutani et al, 1981).

## 6. Conclusão

Ao final do estudo, chegamos às seguintes conclusões:

- Assim como em ratos, em camundongos uma dose de ciclofosfamida induz apoptose das espermatogônias nos primeiros dois dias após tratamento;
- O uso de múltiplas doses de ciclofosfamida não prolongou o período de apoptose induzida por uma dose;
- O tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida eliminou a maioria das células germinativas em diferenciação;
- Múltiplas doses de ciclofosfamida não alteraram drasticamente em número o grupo de espermatogônias indiferenciadas;
- Baseado nos dados de peso testicular e contagem de espermatozóides, seja com uma, ou múltiplas doses, o tratamento com ciclofosfamida via intraperitoneal prejudica mais a espermatogênese em camundongos, do que o tratamento administrado por via oral;
- O tratamento com múltiplas doses de ciclofosfamida altera a capacidade de colonização das espermatogônias-tronco.

## 7. Referências Bibliográficas

- Abercrombie M. (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical Records*, v.94, p.239-247.
- Aponte, P.M.; van Bragt. M.P.A.; de Rooij, D.G.; van Pelt, A.M.M. (2005) Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*, v.113, p.727-42.
- Barroca, V.; Lassalle, B.; Coureuil, M.; Louis, J.P.; Le Page, F.; Testart, J.; Allemand, I.; Riou, L.; Fouchet, P. (2009) Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*. *Nature Cell Biology*, v.11, p.190-6.
- Bolden-Tiller, O.U.; Chiarini-Garcia, H.; Poirier, C.; Alves-Freitas, D.; Weng, C.C.; Shetty, G.; Meistrich, M.L. (2007). Genetic factors contributing to defective spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (*Utp14b/jsd*) mice. *Biology of Reproduction*, v.77, p.237-46.
- Brannan, C.I.; Bedell, M.A.; Resnick, J.L.; Eppig, J.J.; Handel, M.A.; Williams, D.E. (1992) Developmental abnormalities in Steel17H mice result from a splicing defect in the steel factor cytoplasmic tail. *Genes & Development*, v.6, p.1832-42.
- Brinster, R.L. (2002) Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, v.296, p.2174-6.
- Brinster, R.L.; Avarbock, M.R. (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Developmental Biology*, v.91, p.11303-7.
- Brinster, C.J.; Ryn, B.Y.; Avarbock, M.R.; Karagenc, L.; Brinster, R.L. (2003) Restoration of fertility by germ cell transplantation requires efficient recipient preparation. *Biology of Reproduction*; v.69, p.412 –20.



- Brinster, R.L.; Zimmermann, J.W. (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Developmental Biology*, v.91, p.11298-302.
- Buaas, F.W.; Kirsh, A.L., Sharma, M.; McLean, D.J.; Morris, J.L.; Griswold, M.D.; de Rooij, D.G.; Braun R.E. (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, v.36, p.551-3.
- Buageaw, A.; Sukhwani, M.; Ben-Yehudah, A.; Ehmcke, J.; Rawe, V.Y.; Pholpramool, C.; Orwig, K.E.; Schlatt, S. (2005) GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biology of Reproduction*, v.73, p.1011-6.
- Bucci, L.R.; Meistrich, M.L. (1987) Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities and dominant lethal mutations. *Mutation Research*, v.176, p.159-268.
- Cai, L.; Hales, B.F.; Robaire, B. (1997) Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biology of Reproduction*, v.56, p.1490-7.
- Cattanach (1974) Spermatogonial stem cell killing in the mouse following single and fractioned X-ray doses, as assessed by length of sterile period. *Mutation Research*, v.25, p.53-62.
- Chiarini-Garcia, H.; Meistrich, M.L. (2008). High resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *In: Germline Stem Cells*. Ed. Hou S.X. & Singh S.R. Humana Press: USA. 95-107p.
- Chiarini-Garcia, H.; Raymer, A.M.; Russell, L.D. (2003) Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, v.126, p.669-80.
- Chiarini-Garcia, H.; Russell, L.D. (2001) High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1170-78.
- Chiarini-Garcia, H.; Russell, L.D. (2002) Characterization of mouse spermatogonial types by electron microscopy. *Reproduction*, v.123, p.567-77.
- Colvin, M. (2003) Chapter 51: Alkylating Agents and Platinum Antitumor Compounds. *In: Holland-Frei Cancer Medicine*, Ed. Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R.; Bast, R.C.; Gansler, T.S.; Holland, J.F.; Frei, E. BC Decker: Canada. 6<sup>th</sup> Edition.

- Costoya, J.A.; Hobbs, R.M.; Barna, M.; Cattoretti, G.; Manoya, K.; Sukhawani, M.; Orwig, K.E.; Wolgemuth, D.J.; Pandolfi, P.P. (2004) Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics*, v.36, p.653-59.
- Creemers, L.B.; Meng, X.; den Ouden, K.; van Pelt, A.M.; Izadyar, F.; Santoro, M.; Sariola, H.; de Rooij, D. G. (2002) Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biology of Reproduction*; v.66, p.1579-84.
- CYTOXAN: ciclofosfamida, Bristol Myers Squibb Co., Princeton/NJ, USA (2007). Bula de remédio.
- de Rooij, D.G. (1988) Regulation of the proliferation of spermatogonial stem cells. *Journal of Cell Science Supplement*, v.10, p.181-194.
- de Rooij, D.G. (1998) Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, v.79, p.67-80.
- de Rooij, D.G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, v.121, p.347-54.
- de Rooij, D.G.; Okabe, M.; Nishimune, Y. (1999) Arrest of spermatogonial differentiation in *jsd/jsd*, *SI17H/SI17H*, and cryptorchid mice. *Biology of Reproduction*, v.61, p.842-47.
- de Rooij, D.G.; Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, v.21, p.776-98.
- de Rooter-Bootsma, A.L.; Kramer, M.F.; de Rooij, D.G. (1977) Survival of spermatogonial stem cells in the mouse after split-dose irradiation with fission neutrons of 1-MeV mean energy or 300-kV X-rays. *Radiation Research*, v. 71, p. 579-92.
- Dobrinski, I. (2005a) Transplantation. In: *The Sertoli cell biology*. Ed. Skinner M.K. & Griswold M.D. Elsevier: New York, USA. 471-85p.
- Donovan P.J.; de Migue M.P. (2005) Gonocyte development and differentiation. In: *Sertoli Cell Biology*. Ed. Skinner M. K. & Griswold M. D. Elsevier: New York, USA. 417-435p.

- Dobrinski, I. (2005b) Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.137-145.
- Drumond, A.L., Meistrich, M.L., Chiarini-Garcia, H. (2011) Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high resolution light microscopy approach. *Reproduction*. In press.
- Dym, M.; Kokkinaki, M.; He, Z. (2009) Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth defects research. Part C, Embryo today*, v.87, p.27-34.
- Enders G.C, May J.J. (1994) Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Developmental Biology*, v.163, p.331-40.
- Fukutani, K.; Ishida, H.; Shinohara, M.; Minowada, S.; Nijima, T.; Hijikata, K.; et al. (1981) Suppression of spermatogenesis in patients with behçet's disease treated with cyclophosphamide and colchicine. *Fertility and Sterility*, v.36, p.76-80.
- Hasegawa, M.; Wilson, G.; Russell, L.D.; Meistrich, M.L. (1997) Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiation Research*, v.147, p.457-67.
- Hausler C.L.; Russell, L.D. (1999) Prospects for spermatogonial transplantation in livestock and endangered species. In: *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Ed. Gagnon C. Cache River Press: Vienna, USA, 7-45p.
- Hermann, B.P.; Sukhwani, M.; Lin, C.C. ; Sheng, Y. ; Tomko, J. ; Rodriguez, M. ; et al. (2007) Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells* v.25, p.2330-2338.
- Hofmann, M. C.; Braydich-Stolle, L.; Dym, M. (2005) Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Developmental Biology*, v.279, p.114-24.
- Huckins, C. & Clermont, Y. (1968) Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and post-natal life. *Archives of Anatomy, Histology and Embryology*, v.51, p.343-354.
- Hsu, A.C.; Folami, A.O.; Bain, J.; Rance, C.P. (1979) Gonadal function in males treated with cyclophosphamide for nephrotic syndrome. *Fertility and Sterility*, v.31, p.173-178.

- Izadyar, F.; Creemers, L.B.; van Dissel-Emiliani, F.M.F.; van Pelt, A.M.M.; de Rooij, D.G. (2000) Spermatogonial stem cell transplantation. *Molecular Cell Endocrinology*, v.169, p.21-6.
- Kanatsu-Shinohara, M.; Toyokuni, S.; Shinohara, T. (2005) Genetic selection of mouse male germline stem cell in vitro: offspring from single stem cells. *Biology of Reproduction*, v.72, p.236-40.
- Kanatsu-Shinohara, M.; Toyokuni, S.; Morimoto, T.; Matsui, S.; Honjo, T.; Shinohara, T. (2006) Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. *Reproduction*, v.68, p.1801-1807.
- Karashima, T.; Zalatnai, A.; Schally, A.V. (1988) Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against chemotherapy-induced testicular damage in rats. *Proceedings National Academy of Sciences of USA*, v.85, p.2329-2333.
- Koh, K-B.; Komiyama, M.; Toyama, Y.; Adachi, T.; Mori, C. (2004) Percoll fractionation of adult mouse spermatogonia improves germ cell transplantation. *Asian Journal of Andrology*, v.6, p.63-98.
- Kubota H.; Avarbock, M.R.; Brinster R.L. (2003) Spermatogonial stem cell share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.100, p.6487-92.
- Lawson, K.A., Pedersen, R.A. (1992) Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. In: *CIBA foundation symposium 165 Post implantation development in the mouse*. John Wileys & Sons: New York, USA, 3-26 p.
- Lu, C.C.; Meistrich, M.L. (1979) Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Research*, v.39, p.3575-82.
- McLean, D.J. (2005) Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell and Tissue Research*, v.322, p.21-31.
- McLean, D.J.; Friel, P.J.; Johnston, D.S.; Griswold, M.D. (2003) Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biology of Reproduction*, v.69, p.2085-91.
- Meistrich, M.L. (1982) Quantitative relation between testicular stem cell survival, sperm production, and fertility in the mouse after treatment with different cytotoxic agents. *Journal of Andrology*, v.3, p.58-68.

- Meistrich, M.L. (2009) Male gonadal toxicity. *Pediatric Blood Cancer*, v.53, p.261-6.
- Meistrich, M.L.; Bruce, W.R.; Clermont, Y. (1973) Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation. *Experimental Cell Research*, v.79, p.213-27.
- Meistrich, M.L.; Finch, M.; da Cunha, M.F.; Hacker, U.; Au, W.W. (1982) Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Research*, v.42, p.122-131.
- Meistrich, M.L.; Finch, M.; Lu, C.C.; de Ruiter-Bootsma, A.L.; de Rooij, D.G. (1984) Strain differences in the response of mouse testicular stem cells to fractionated radiation. *Radiation Research*, v. 97, p. 478-87.
- Meistrich, M.L.; Trostle, P.K. (1975) Separation of mouse testis cells by equilibrium density centrifugation in renografin gradients. *Experimental Cell Research*, v.92, p.231-44.
- Meng, X.; Lindahl, M.; Hyvonen, M.E.; Parvinen, M.; de Rooij, D.G; Hess, M.W. Raatikainen-Ahokas, A.; Sainio, K.; Rauvala, H.; Lakso, M.; Pichel, J.G.; Westphal, H.; Saarma, M.; Sariola, H. (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, v.287, p.1489-93.
- Nakagawa, T.; Nabeshima, Y.; Yoshida, S. (2007) Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Development Cell*, v.12, p.195-206.
- Nakagawa, T.; Sharma, M.; Nabeshima, Y.; Braun, R.E.; Yoshida, S. (2010) Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenesis stem cell compartment. *Science*, v.328, p.62-67.
- Nagano, M.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. (1999) Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 1429-36.
- Naughton, C.K.; Jain, S.; Strickland, A.M.; Gupta, A.; Milbrandt, J. (2006) Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor-Mediated RET Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate. *Biology of Reproduction*, v.74, p.314-21.
- Nishimune, Y.; Aizawa, S.; and Komatsu, T. (1978). Testicular germ cell differentiation *in vivo*. *Fertility and Sterility*, v.29, p.95–102.

- Oatley, J.M; Brinster, R.L. (2006) Spermatogonial stem cells. *Methods in Enzimology*, v.419, p.259-82.
- Ogawa, T.; Dobrinski, I.; Brinster, R.L. (1999) Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in rat. *Tissue Cell*, v. 31, p. 29-34.
- Ogawa, T.; Ohmura, M.; Yumura, Y.; Sawada, H.; Kubota, Y. (2003) Expansion of murine spermatogonial stem cells through serial transplantation. *Biology of Reproduction*, v.68, p.316-22.
- Orwig, K.E.; Ryu, B.Y.; Master, S.R.; Phillips, B.T.; Mack, M.; Avarbock, M.R.; Chodosh, L.; Brinster, R.L. (2008) Genes involved in post-transcriptional regulation are overrepresented in stem/progenitor spermatogonia of cryptorchid mouse testes. *Stem Cells*, v.26, p.927-38.
- Ohta, H.; Yomogida, K.; Dohmae, K.; Nishimune, Y. (2000) Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development*, v.127, p.2125-31.
- Parreira, G. G.; Ogawa, T.; Avarbock, M. R.; Franca, L. R.; Brinster, R. L.; Russell, L. D. (1998) Development of germ cell transplants in mice. *Biology of Reproduction*, v.59, p.1360-70.
- Pellegrini, M.; Grimaldi, P.; Rossi, P.; Geremia, R.; Dolci, S. (2003) Developmental expression of BMP4/ ALK3/ SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: A potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *Journal of Cell Science*, v.116, p.3363-72.
- Raverot G.; Weiss, J.; Park, S.Y.; Hurley, L.; Jameson, J.L. (2005) Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Developmental Biology*, v.283, p.215.
- Russell, L.D.; Russell, J.A. (1991) Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *American Journal of Anatomy*, v.192, p.142-168.
- Russell, L.D.; Ettlín, R.A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E.D. (1990). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1<sup>st</sup>ed. Cache River Press: Vienna, USA. 280p.

- Shinohara T.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. (1999)  $\beta$ 1- and  $\alpha$ 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.96, p.5504-9.
- Shinohara, T.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. (2000) Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. *Developmental Biology*, v.220, p.401-11.
- Shinohara, T.; Orwig, K.E.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. (2001) Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *PNAS*, v.98, p.6186-91.
- Shinohara, T.; Orwig, K.E.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L. (2002) Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes. *Biology of Reproduction*, v.66, p.1491-7.
- Sprando, R.L. (1990) Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. *In: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Ed. Russell L.D., Ettlín R.A., Sinha Hikim A.P., Clegg E.D. Cache River Press: Vienna, USA. 277-80p.
- Tummers, M.; Thesleff, I. (2003) Root or crown: A developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development*, v.130, p.1049-57.
- Udagawa, K.; Ogawa, T.; Watanabe, T.; Yumura, Y.; Takeda, M.; Hosaka, M. (2001) GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *International Journal of Urology*, v.8, p.615-22.
- Velez de la Calle, J.F.; de Queiroz, F.; Gamier, D.H.; Kercret, H.; Folliot, R.; Jegou, B. (1989) Reproductive effects of the anticancer drug cyclophosphamide in male rats at different ages. *Archives of Andrology*, v.22, p.251-263.
- Vergouwen, R.P.F.A.; Jacobs, S.G.P.; Huiskamp, R.; Davids, J.A.G.; de Rooij, D.G. (1991) Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.233-243.
- Wang, G.; Shao, S.H.; Weng, C.C.; Wei, C.; Meistrich, M.L. (2010) Hormonal suppression restores fertility in irradiated mice from both endogenous and donor-derived stem spermatogonia. *Toxicology Science*, v.117, p.225-237.

- Weber, J. E.; Russell, L. D. (1987) A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *American Journal Anatomy*, v.180, p.1-24.
- Withers, H.R.; Hunter, N.; Barkley Jr., H.T.; Reid, B.O. (1974) Radiation survival and regeneration characteristics of spermatogenic stem cells of mouse testis. *Radiation Research*, v.57, p.88-103.
- Yoshida, S.; Takakura, A.; Ohbo, K.; Abe, K.; Wakabauashi, J.; Uamamoto, M., et al. (2004) Neurogenin 3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Developmental Biology*, v.269, p.447-58.
- Yoshida, S.; Nabeshima, Y.; Nakagawa, T. (2007) Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1120, p.47-58.
- Yoshinaga, K.; Nishikawa, S.; Ogawa, M.; Hayashi, S.; Kunisada, T.; & Fujimoto, T. (1991) Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*, v.113, p.689-99.
- Zallio, R.C. (2009) Avaliação morfofuncional de espermatogônias de camundongos mutantes *Utp14b<sup>JSD</sup>* sob condições normais de temperatura e após criptorquidismo experimental. Dissertação (Mestrado), Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas. 43p.
- Zhang, Z.; Shao, S.; Meistrich, M.L. (2007) The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *Journal of Cell Physiology*, v.211, p.149-158.
- Zhang, Z.; Shao, S.; Meistrich, M.L. (2006) Irradiated mouse testes efficiently support spermatogenesis derived from donor germ cells of mice and rats. *Journal of Andrology*, v.27, p.365-375.
- Zhang, Z.; Shao, S.; Shetty, G.; Meistrich, M. (2009) Donor Sertoli cells transplanted into irradiated rat testes stimulate partial recovery of endogenous spermatogenesis. *Reproduction*, v.137, p.497-508.



**ANEXO I - TRABALHO PUBLICADO**

# Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach

Ana Luiza Drumond, Marvin L Meistrich<sup>1</sup> and Hélio Chiarini-Garcia

Laboratory of Structural Biology and Reproduction, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil and <sup>1</sup>Department of Experimental Radiation Oncology, M.D. Anderson Cancer Center, The University of Texas, Houston, Texas 77030-4095, USA

Correspondence should be addressed to H Chiarini-Garcia; Email: [chiarini@icb.ufmg.br](mailto:chiarini@icb.ufmg.br)

## Abstract

Despite the knowledge of spermatogonial biology in adult mice, spermatogonial development in immature animals has not been fully characterized. Thus, the aim of this study was to evaluate the ontogeny of the morphological development of the spermatogonial lineage in *C57BL/6* mouse testis, using high-resolution light microscopy. Spermatogonial morphology, chronology, and absolute number were determined for different ages *postpartum* (*pp*). The morphology of spermatogonia in immature mice was similar to that of adult spermatogonia, although their nuclear diameter was slightly smaller. The A<sub>1</sub> spermatogonia were first observed on day 2 *pp*, and only 24 h later, differentiating type A<sub>3</sub> and A<sub>4</sub> spermatogonia were observed in the seminiferous cords. This result indicated a shortening of the spermatogonial phase for immature mice of about ~2.5 days when compared with adult mice and suggests that gonocytes and/or A<sub>1</sub> spermatogonia could directly become A<sub>4</sub> spermatogonia, skipping the developmental sequence of type A spermatogonia. These A<sub>4</sub> spermatogonia are functional as they develop into type B spermatogonia by day 5 *pp*. At day 8 *pp*, while differentiation to spermatocytes begins, the A<sub>und</sub> spermatogonia reach their maximal numbers, which are maintained through adulthood. The various details of the spermatogonial behavior in immature normal mice described in this study can be used as a baseline for further studies under experimental or pathological conditions.

*Reproduction* (2011) **142** 145–155

## Introduction

At birth, the seminiferous cords of mammalian testes contain germ cells called gonocytes that are located in the center of the seminiferous cords and are arrested in the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle. In rodents, after birth, the gonocytes relocate toward the basal membrane (McGuinness & Orth 1992) and resume proliferation, giving rise, after several steps, to the adult spermatogonial stem cell (de Rooij & Grootegoed 1998, de Rooij & Russell 2000). The passage from gonocytes to spermatogonial stem cells is not completely understood. Some authors described that the gonocytes generate an intermediate cell type called pre-spermatogonia (Huckins & Clermont 1968), whereas others have shown that the gonocytes can give rise to either spermatogonial stem cells or differentiating spermatogonia (Kluin & de Rooij 1981, Yoshida *et al.* 2006).

In adult mammals, primarily based on the data from rodents, the spermatogonial stem cell is known as an A single (A<sub>s</sub>) spermatogonium and is capable of

self-renewal or differentiation (de Rooij & Grootegoed 1998, de Rooij & Russell 2000). Once it starts its path toward differentiation, the A<sub>s</sub> spermatogonia give rise, through mitosis, to two daughter cells that remain connected by intercellular bridges and are called A paired (A<sub>pr</sub>) spermatogonia. These cells divide forming chains of spermatogonia, the A aligned (A<sub>al</sub>) spermatogonia, which can divide two or three times more in mice. The group formed by A<sub>s</sub>, A<sub>pr</sub>, and A<sub>al</sub> is known as undifferentiated type A spermatogonia (A<sub>und</sub>). The A<sub>al</sub> spermatogonia will differentiate, with no mitotic division, to the differentiating type A<sub>1</sub> spermatogonia. The type A<sub>1</sub> spermatogonia undergo six successive mitotic divisions to yield A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, intermediate-type (In), and type B spermatogonia. The type B spermatogonia will divide giving rise to spermatocytes, starting the meiotic process.

Although previous studies could not distinguish the various A spermatogonial subtypes, high-resolution light microscopy was able to differentiate the spermatogonial

types in adult mice (Chiarini-Garcia & Russell 2001). The ability to distinguish these spermatogonial subtypes under light microscopy has made it possible to better understand details of spermatogonial biology in rodents under normal (Chiarini-Garcia *et al.* 2003), experimental (Nascimento *et al.* 2008), and genetically pathological (Russell *et al.* 2002, Bolden-Tiller *et al.* 2007) conditions. However, this new morphological approach has not been used to evaluate the early events of spermatogenesis development.

Thus, the goal of this study was to provide a thorough characterization of the morphology and developmental kinetics of the spermatogonial subtypes during testis development, using a high-resolution method, in order to characterize the ontogeny of this process. In addition to addressing specific questions in this process, such as the transition from gonocytes to spermatogonia, it was also our goal to provide a standard that could be used as a baseline for future functional and pathological studies.

## Results

The body weights, body lengths (0–14 days), and testicular weights obtained from mice of different ages are shown in Table 1.

### Germ cell emergence and spermatogonial synchrony

The timing of appearance of specific germ cells during ontogeny in the testes is shown in Table 2. The different types of spermatogonia are defined according to the criteria of Chiarini-Garcia & Russell (2001) and are shown in Fig. 1 that are to be also observed in immature mice. The days of the first emergence of each germ cell type, from the gonocytes at birth up to elongated spermatids in adulthood, are presented in a semi-quantitative manner (Table 2). The morphology of the gonocytes is shown in Fig. 2 and the different

subtypes are defined below. At birth and at day 1 *postpartum* (*pp*), only gonocytes were observed in seminiferous cords (Fig. 2a and b).

On the second day,  $A_{und}$  and  $A_1$  spermatogonia were first seen, and on the third and fourth days, spermatogonial types up to  $A_3$  and possibly  $A_4$  spermatogonia were already observed. On days 5 and 6, all the spermatogonial types, as such  $A_{und}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ,  $I_n$ , and  $B$  spermatogonia were seen, although the most differentiated ones were seen with low frequency (Fig. 2c and d). The meiotic cells were seen on day 8, when preleptotene spermatocytes were observed. At this time, it was possible to observe that the synchrony of the seminiferous epithelial stages between spermatogonia and spermatocytes as defined in the adult was already found; for example, the type  $A_2$  spermatogonia were associated with leptotene spermatocytes (Fig. 3a). Based on the appearance of cells, we calculated that the first spermatogonial development in immature mice from  $A_1$  to  $A_3$  and possibly  $A_4$  spermatogonia occurred in  $\sim 1$  day and from  $A_1$  to  $B$  spermatogonia in 3 days (Table 2).

The appearance of later stages of spermatocytes beyond leptotene was observed starting on day 10 *pp*. After formation of the tubular lumen, at 12 days *pp* (Fig. 3b), pachytene spermatocytes were detected in low numbers for the first time in the seminiferous tubules and were frequently observed at 14 days (Fig. 3c) and were associated with type  $A_3$  and  $A_4$  spermatogonia. Meiotic figures were first seen at day 20 (Fig. 3d), when once again we could observe the synchrony as they were associated with type  $A_3$  spermatogonia and early pachytene spermatocytes, as in adults.

The round spermatids were formed after day 20 and the first elongated spermatids were observed at day 27 (Fig. 3e), making it possible to identify all stages of the seminiferous epithelium by the acrosomal system. On day 37 *pp*, the spermatogenic process was completely developed (Fig. 3f).

### Gonocyte and spermatogonial morphology

In the seminiferous cords, the gonocytes pass through several morphological and positioning changes before they generate the type  $A_{und}$  spermatogonia. We divided these cells into three morphologically distinct subtypes, namely I, II, and III, to further study their numbers and kinetics in an attempt to separate them into functionally different cells. All the gonocyte types had large nuclei, 10–12  $\mu\text{m}$ , and one to three nucleoli. Whereas the gonocyte subtype I had round nuclei, there was a progressive change to a slightly oval shape by gonocyte type III. The morphological features that allowed us to separate these three subtypes of gonocytes are as follows:

Gonocyte subtype I (Fig. 2a and e) contained condensed round nucleoli and a regular cytoplasmic membrane with no projections. They were usually

**Table 1** Biometrical values from mice at different ages.

Age	Body weight (g)	Snout-to-rump distance (mm)	Testis weight (mg)
0	1.4 $\pm$ 0.1	31 $\pm$ 1	0.6 $\pm$ 0.1
1	1.4 $\pm$ 0.0	31 $\pm$ 1	0.6 $\pm$ 0.1
2	1.9 $\pm$ 0.2	34 $\pm$ 1	0.9 $\pm$ 0.1
3	2.5 $\pm$ 0.0	36 $\pm$ 1	1.3 $\pm$ 0.1
4	2.5 $\pm$ 0.1	37 $\pm$ 0	1.4 $\pm$ 0.1
5	3.6 $\pm$ 0.2	40 $\pm$ 1	2.0 $\pm$ 0.2
6	3.5 $\pm$ 0.1	43 $\pm$ 1	2.2 $\pm$ 0.1
8	5.4 $\pm$ 0.2	48 $\pm$ 1	3.6 $\pm$ 0.2
10	5.5 $\pm$ 0.1	50 $\pm$ 1	4.4 $\pm$ 0.2
12	8.1 $\pm$ 0.2	58 $\pm$ 1	8.0 $\pm$ 0.8
14	7.7 $\pm$ 0.5	59 $\pm$ 1	7.3 $\pm$ 0.8
17	5.0 $\pm$ 0.0	—	10 $\pm$ 0.3
20	7.7 $\pm$ 0.4	—	14 $\pm$ 0.4
27	17.1 $\pm$ 1.3	—	48 $\pm$ 2.0
37	20.2 $\pm$ 0.4	—	70 $\pm$ 2.8
70	27.8 $\pm$ 0.5	—	104 $\pm$ 1.9

The values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

**Table 2** Occurrence of germ cells (GC) at specific stages of development during post natal development in mice.

Days	0	1	2	3	4	5	6	8	10	12 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>	17 <sup>c</sup>	20	27 <sup>d</sup>	37	70
Gonocytes subtype I	+++	+++	+	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Gonocytes subtype II	+++	+++	++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Gonocytes subtype III	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A undifferentiated spermatogonia	---	---	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Spermatogonia A <sub>1</sub>	---	---	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A <sub>2</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A <sub>3</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A <sub>4</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
In	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Preleptotene	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Leptotene	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Zygotene	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Early pachytene	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Intermediate pachytene	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Late pachytene	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Diplotene	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spermatocytes II	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Round spermatids	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Elongated spermatids	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

---, Lack of GC; ++, intermediate amount of GC; +, low amount of GC; ++++, high amount of GC. The number of germ cells was classified compared with that in the subsequent ages; +, ++, +++, indicates that number of germ cells was not distinguishable from that in a normal adult mouse.

<sup>a</sup>The most advanced pachytene here are associated with preleptotenes and B spermatogonia. <sup>b</sup>The most advanced pachytene here are associated with spermatogonia A<sub>2</sub>. <sup>c</sup>The most advanced pachytene here are associated with zygotenes. <sup>d</sup>Elongated spermatids in step 16.

located in the center of the seminiferous cords but always separated from the basement membrane (Fig. 2a).

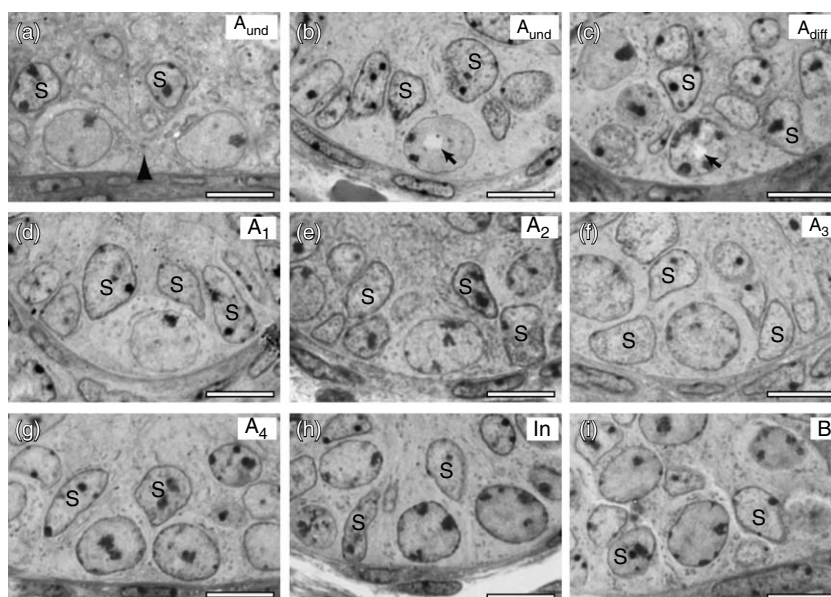
The nucleoli of gonocytes subtype II (Fig. 2f) were less condensed with a reticulated appearance more of an irregular shape. Although these cells were located in the center of the cords, they had cytoplasmic projections extending toward the basal membrane. These cells were frequently seen with a peculiar structure resembling acrosomal vesicles, located close to the nuclear envelope.

The nucleoli of gonocytes subtype III (Fig. 2b and g) were even less condensed and reticulated and had an irregular shape and were usually close to the nuclear envelope; spots of heterochromatin were observed, associated with the nuclear envelope; cytoplasmic membrane was irregular, but with no projections. These cells were seen lying on the basal membrane (Fig. 2b).

In contrast to the gonocytes, the A<sub>und</sub> spermatogonia had a smaller nuclear diameter and a more oval shape, had more finely granular and darker euchromatin but lacked the spots of heterochromatin associated to the nuclear envelope of gonocytes, and the nucleoli were somewhat more condensed but more irregular. The differentiating type A spermatogonia were distinguished from the A<sub>und</sub> by their nuclear morphology (Fig. 1) as described in detail previously (Chiarini-Garcia & Russell 2001), becoming larger, more lightly staining, and with increasing heterochromatin associated with the nuclear membrane. The A<sub>2</sub> to A<sub>4</sub> spermatogonia were distinguished from type III gonocytes by broader contact with the basement membrane, a more oval nuclear shape, and more irregular nucleoli.

The only noticeable differences in a given spermatogonial type, between postnatal (6 days) and adult (70 days) mice, were the nuclear diameters (see below). A morphologically peculiar type of A spermatogonia was observed in young animals (Fig. 1c). These cells had many of the morphological characteristics of differentiating type A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> spermatogonia, having an oval to round nucleus, with spots of heterochromatin around the nuclear membrane and a large, reticulated nucleolus. However, they have nuclear vacuoles, described in the literature as being located only in nuclei of type A undifferentiated cells (Chiarini-Garcia & Russell 2001). Such nuclear vacuoles in differentiating spermatogonia were observed predominantly from 3 to 6 days *pp*, being less common in the animals that were 8 and 10 days old and were not observed in sexually mature mice.

Although this study using an accurate histological technique allowed the precise identification of almost all germ cell types during ontogenetic development, the least differentiated spermatogonial type, the A<sub>und</sub> spermatogonia, could not be more finely sub-classified to suggest which of these cells might be stem spermatogonia.



**Figure 1** Spermatogonial lineage from mice at ages 2 to 6 days *postpartum*. (a and b) Type A undifferentiated spermatogonia, one of them with a nuclear vacuole (arrow); (c–i) differentiating spermatogonia, (c) with a nuclear vacuole (arrow), (d–g) A<sub>1</sub> to A<sub>4</sub> spermatogonia, (h) Intermediate – In, and (i) B spermatogonia. S, immature Sertoli cell and arrowhead, intercellular bridge. Bars represent 10 μm.

### Spermatogonial nuclear diameter

Figure 4 shows the average diameters of germ cell nuclei from the A<sub>und</sub> to type B spermatogonia from 2 up to 70 days *pp*. It was observed that diameters varied during the germ cell and testes development. In all ages, the A<sub>und</sub> spermatogonia have a smaller nuclear diameter than the differentiating type A spermatogonia. The type A<sub>2</sub> spermatogonia were found to be the cells with the largest nuclear diameter, whereas the spermatogonia type B were the smallest (Fig. 4). The nuclear diameter of each cell type from the A<sub>und</sub> to In spermatogonia seemed to be larger in younger animals and decreased in size during the development, reaching their smallest nuclear diameters by 37 days *pp*.

### Gonocyte and spermatogonial numbers

The changes in the total numbers of each spermatogonial type per testis during testicular development were analyzed by stereological methods. The number of gonocytes decreased progressively from birth to 3 days *pp*, whereas the numbers of differentiating type A, In, and B spermatogonia increased progressively up to 37 days, at puberty (Fig. 5A and B). The number of A<sub>und</sub> spermatogonia at 8 days *pp* was 190 000 per testis, similar to the number of type A<sub>und</sub> spermatogonia at all subsequent ages (Fig. 5B), including the adult animals. In addition, the number of all differentiating spermatogonia reached the numbers found in the adult between 14 and 37 days *pp* (Fig. 5B).

### Gonocyte and spermatogonial kinetics

The total number of gonocytes remained constant during the first 24 h after birth (Fig. 6). When the number of

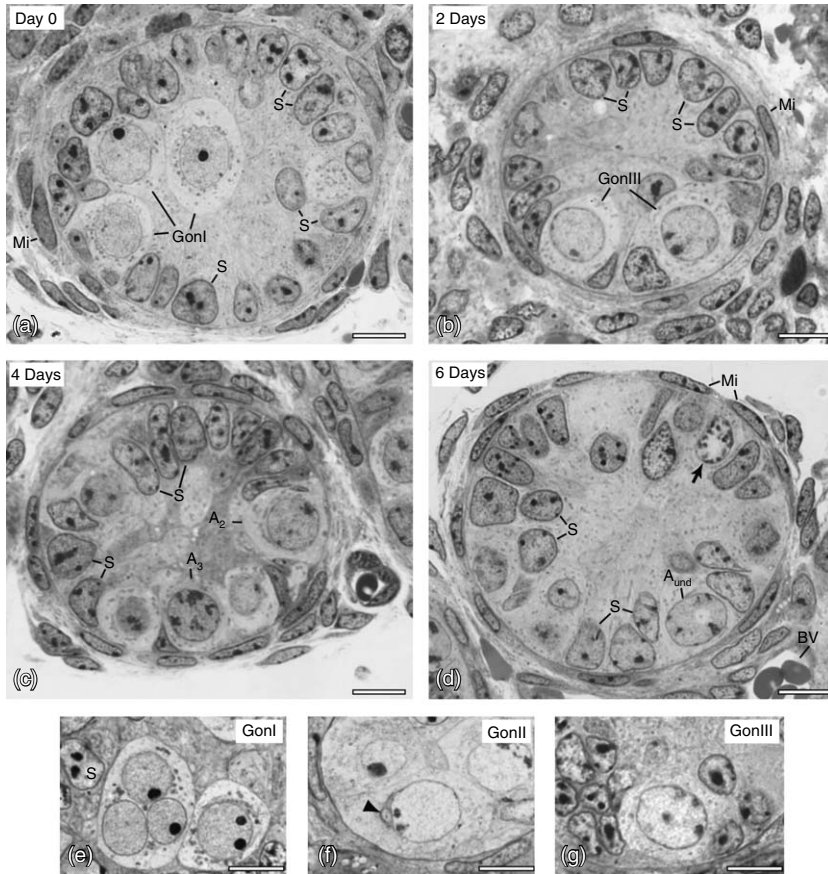
gonocytes of subtypes I and II went down, the number of gonocytes of subtype III increased, indicating that the former subtypes may differentiate into the latter subtype. However, it was observed that the number of gonocytes started to decline on day 2 *pp* coincident with the appearance of the first A<sub>und</sub> spermatogonia that start to be seen in the seminiferous cords. The decline in the total numbers of gonocytes on day 2 could possibly account for the increase in A<sub>und</sub> spermatogonia at that time by direct transformation of gonocytes into A<sub>und</sub> spermatogonia. However, the further increase in A<sub>und</sub> spermatogonia on day 3 is too large to be accounted for merely by the transformation of gonocytes and must include cell division.

### Gonocyte and spermatogonial mitosis and apoptosis

The mitotic index of germ cells (gonocytes plus spermatogonia) showed an increase from birth to 3 days *pp* (Fig. 7), remained high until the fifth day, and then started to decrease, reaching the adult level at 10 days *pp*. The apoptotic index significantly increased after birth up to 2 days *pp* (Fig. 7); at this time only, gonocytes were found in the seminiferous cords, pinpointing this developmental age as the time of a high number of gonocyte deaths. The apoptotic index then decreased, and already at 3 days *pp*, it reached a number as low as adult animals, remaining at this level throughout testis development.

### Discussion

In this study, we have extended high-resolution light microscopy techniques to quantify the numbers of different types of gonocytes and spermatogonia cells



**Figure 2** Seminiferous cords at day 0 (a), 2 days (b), 4 days (c), and 6 days (d) *postpartum*. Note the different morphological subtypes of gonocytes: gonocyte subtype I (e), gonocyte subtype II (f) with a structure close to the nuclear membrane (arrow head), and subtype III (g). Structures identified in the seminiferous cords and interstitium are labeled as follows: Sertoli cell (S), Sertoli cells in prophase (arrow), gonocyte subtype I (GonI), subtype II (GonII) and subtype III (GonIII), type A undifferentiated spermatogonia ( $A_{und}$ ), type  $A_2$  and type  $A_3$  differentiating spermatogonia, myoid cells (Mi), and blood vessels (BV). Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

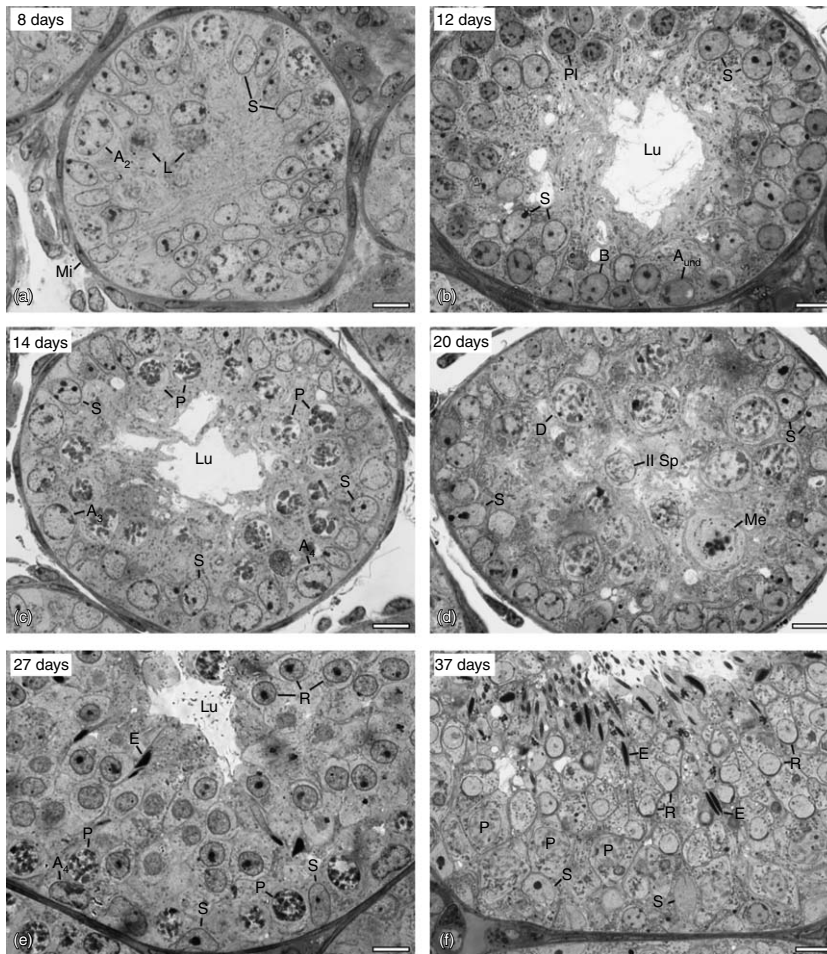
during postnatal development in the mouse. The implications of these observations for understanding the development of spermatogonia from gonocytes, the proliferation, differentiation, and kinetics of spermatogonial development and the formation of associations of the cycle of the seminiferous epithelium is discussed below.

Although we have observed different subclasses of gonocytes, which could be recognized by their morphology, number, and position in the seminiferous cords as gonocytes I, II, or III, the total number of gonocytes did not increase after birth. The mitotic index data showed that the gonocytes proliferate immediately after birth but their number did not change due to a balance between mitosis and apoptosis, which was also increased during this period. This is consistent with previous observations showing that during the first days after birth, some of the gonocytes go through mitosis (Kluin & de Rooij 1981), but a considerable number of gonocytes degenerate (Roosen-Runge & Leik 1968).

Kluin & de Rooij (1981) also reported that the daughter cells of the gonocyte divisions on day 1 consist of two cell types, the typical gonocytes, called type I, and cells with larger nuclei, called type II cells. Huckins & Clermont (1968) showed that in rats, gonocytes divide

to form cells larger and lighter than the  $A_{und}$  spermatogonia normally found in adults and named these cells pre-A spermatogonia. Both descriptions of the gonocytes' daughter cells agree with our description for the subtype III gonocytes. As the method applied in our paper allowed better cytological distinction of the germ cells than the methods used previously, we could distinguish three gonocyte subtypes (I, II, and III) instead of two types (I and II). Kluin & de Rooij (1981) consider the type II gonocytes to be similar to newly formed  $A_2$  spermatogonia in adults. Our data suggest that the cells found to be type II by those authors were recognized here as subtype II and III, because the number of these cells was 67% of the total gonocytes that are very close to their percentage of type II cells (70%). Although we agree that these gonocytes are similar to type  $A_2$  spermatogonia, we could still morphologically recognize the spermatogonial subtypes in young mice, and it was possible to show that the gonocytes II and III are morphologically different from type  $A_2$  spermatogonia.

The emergence of type  $A_{und}$  and  $A_1$  spermatogonia, at day 2, morphologically similar to the those observed in adult mice, is consistent with the results of Yoshida *et al.* (2006), who demonstrated at 2 days *pp* the presence of the first germ cells that expressed KIT (c-Kit) receptor in the seminiferous cords. Furthermore, they showed that

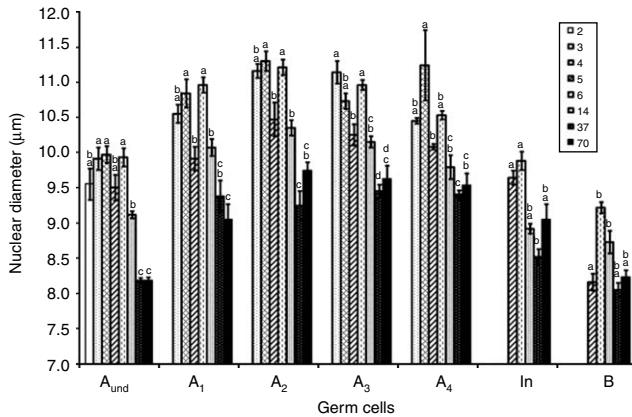


**Figure 3** Seminiferous epithelium at ages of 8 days (a), 12 days (b), 14 days (c), 20 days (d), 27 days (e), and 37 days (f) *postpartum*. Structures indicated are Sertoli cells (S), type A undifferentiated ( $A_{und}$ ), type  $A_2$  differentiating spermatogonia ( $A_2$ ), type  $A_3$  differentiating spermatogonia ( $A_3$ ), type  $A_4$  differentiating spermatogonia ( $A_4$ ), type B differentiating spermatogonia (B), pre-leptotene (Pl), leptotene (L), pachytene (P), diplotene (D), secondary spermatocyte (II Sp), round spermatid (R), elongated spermatid (E), and lumen (Lu). Bars represent 10  $\mu$ m.

these cells must correspond to a population of germ cells that skip at least one of the molecular steps of spermatogonial differentiation that occurs in adults, because the KIT-positive cells that were rapidly formed did not express neurogenin 3 (NGN3), which is expressed in type A undifferentiated spermatogonia of the adult mice (Yoshida *et al.* 2006). This result indicates that the first type A differentiating spermatogonia ( $A_1$  and/or  $A_2$  spermatogonia) are part of a cell population that is directly derived from the gonocytes separately from the  $A_{und}$  spermatogonia. The later development of differentiating spermatogonia, which have gone through a stage of NGN3 expression, must come from a subset of these  $A_{und}$  cells, which correspond both morphologically and functionally to the adult spermatogonial stem cells.

In this study, the first type  $A_1$  spermatogonia were seen in the seminiferous cords at 2 days *pp*, and surprisingly only 24 h later, spermatogonia morphologically similar to type  $A_3$  and possibly some  $A_4$  spermatogonia were also observed. In adult mice, three mitotic divisions are required for a differentiating spermatogonia type  $A_1$  to become type  $A_4$  spermatogonia, and this process requires a time interval of about 3.5 days (Clermont &

Trott 1969, de Rooij & Russell 2000). This short time suggests that gonocytes and/or  $A_1$  spermatogonia are directly becoming  $A_3$  and/or  $A_4$  spermatogonia. Although it might be argued that the  $A_3$  and  $A_4$  spermatogonia produced on days 3 and 4 are not functionally the same as those in the adult, they do go on to produce B spermatogonia on day 5, preleptotenes on day 8, zygotene spermatocytes on day 10, and pachytene on day 12; thus, they are functionally acting as differentiated type A spermatogonia. The data in Table 2 can also be used to calculate that, in immature mice, the formation of B spermatogonia (day 5 *pp*) from  $A_1$  spermatogonia (day 2 *pp*) occurs in 3 days, whereas in adults this transition requires 6.1 days, showing that the process was shortened  $\sim 3$  days, which appears to have largely been due to the acceleration of type A spermatogonial development between days 2 and 3. Hence, our results indicate that there is acceleration of the spermatogonial phase, involving skipping generations of the developmental sequence of the type A spermatogonia that are normally observed in adults. It should be noted that in this study, the steps involved in this acceleration were only morphologically defined. The combination of immunohistochemistry



**Figure 4** Nuclear diameters of spermatogonia ( $A_{und}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In, and B) in some of the analyzed ages. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Different letters show significant differences in the nuclear diameter of the same cell type among different ages ( $P < 0.05$ ).

for spermatogonial markers and morphology is necessary to further characterize the development in molecular terms.

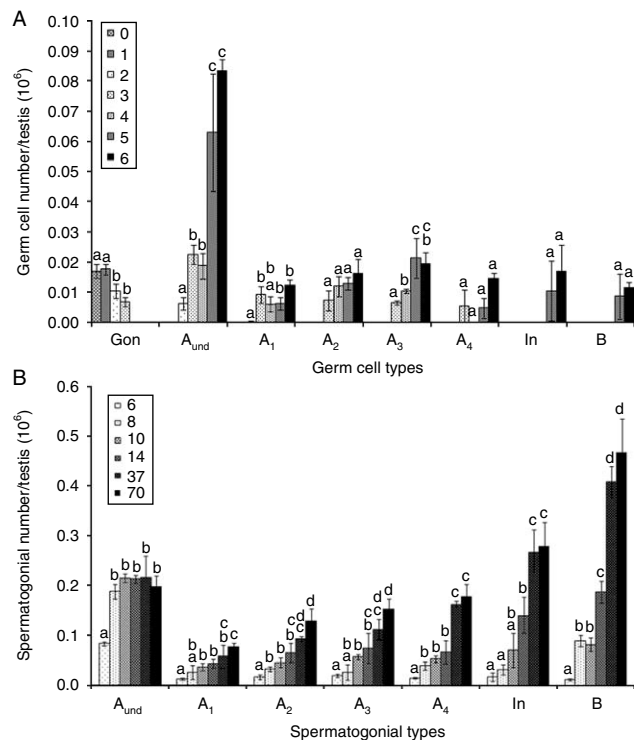
Thus, our data showed that the shorter timing of the spermatogenesis in the immature C57BL6 mice was, at least partially, due to an acceleration of the spermatogonial phase. However, the faster development of spermatocytes and/or spermatids in immature *Cpb-N* mice observed by Kluin *et al.* (1982) was not observed in the present investigation. Possible reasons for this discrepancy could be due to the broad interval between 17 and 27 days *pp* in our study, which may lack the resolution necessary to observe a small acceleration or differences among the strains of mice.

It is well known that spermatogenesis in adult mammals occurs in a cycle and that each differentiating germ cell in the seminiferous epithelium is always associated with specific other types of germ cells, constituting the stages of the seminiferous epithelium, which in mice can be classified into 12 different stages (Oakberg 1956, Russell *et al.* 1990). Although we cannot precisely stage the cross sections of the tubules through the acrosomal system before the appearance of spermatids, from 8 days *pp*, when the first primary spermatocytes can be observed, onward, the spermatogonial subtypes are associated in the same manner with the more differentiating cells following the same stage relationships as seen in adult mice. This confirms that the spermatogonial organization is already regulated, even before the Sertoli cells become mature (Vergouwen *et al.* 1991, Joyce *et al.* 1993). This observation is consistent with data showing that the genes expressed in adult Sertoli cells in a cyclical manner are already expressed in young immature Sertoli cells (Timmons *et al.* 2002).

It is useful to relate the data obtained here on the number of  $A_{und}$  spermatogonia to the stem cell potential

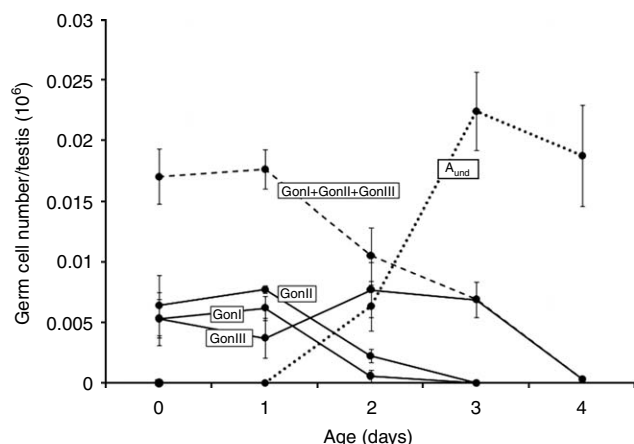
in transplantation experiments. Although it was generally believed that the  $A_s$  spermatogonia within the  $A_{und}$  population contain the stem cells (de Rooij & Russell 2000), recent data indicate that the  $A_{pr}$  and  $A_{al}$  spermatogonia can also occasionally undergo clone fragmentation and normally have a low potential to be stem cells (Nakagawa *et al.* 2010). However, their potential for producing stem cells is increased when these cells are used for spermatogonial transplantation (Nakagawa *et al.* 2007). Thus it is reasonable to consider the total numbers of  $A_{und}$  spermatogonia as at least a crude measure of the stem cell potential in transplantation experiments.

It is interesting to note that 8-day-old animals, although being quite young, have the same total number of type  $A_{und}$  spermatogonia in the whole testis as do adult animals. Most spermatogonial transplantation experiments use young animals as donors of germ cells (Shinohara *et al.* 2001, McLean *et al.* 2003), finding that 12-day-old mice seem to be the best donors. McLean *et al.* (2003) found that the germ cells of these animals produced a higher number of colonies in the recipient testes than those from 1 to 5 days *pp* mice, consistent with the present observation of a greater number of  $A_{und}$  spermatogonia in the 12-day-old mice. The observation that 10- or 12-day-old mice were more efficient at



**Figure 5** Total number of gonocytes and spermatogonia per testis from 0 to 6 days *postpartum* (A) and at 6, 8, 10, 14, 37, and 70 days *postpartum* (B). Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Different letters represent significant differences between different ages for each cell type analyzed ( $P < 0.05$ ).





**Figure 6** Total number of gonocytes (GonI, GonII, and GonIII) and type A undifferentiated spermatogonia ( $A_{und}$ ) per testis from 0 to 4 days *postpartum*. Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

colonizing recipient testes (McLean *et al.* 2003) is consistent with the observation in this study, that the number of type  $A_{und}$  spermatogonia in 10- to 12-day-old mice is between 30 and 50 million/g testis, whereas the number of  $A_{und}$  spermatogonia in the adult mice is 1.9 million/g (Fig. 5 and Table 1).

In conclusion, our data showed, for the first time, that animals at 8 days *pp* have maximal numbers of type  $A_{und}$  spermatogonia in the testis parenchyma and higher concentrations of these cells when compared with adult mice. Furthermore, the data confirm that the spermatogenic cell differentiation occurs faster in young animals than in adults, by skipping multiple divisions of differentiating type A spermatogonia resulting in a shortening of  $\sim 2.5$  days in the spermatogonial phase. Overall, the capacity to identify the different spermatogonial subtypes by their morphological characteristics in a normal ontogenetic process could be used as a tool to better understand spermatogonial biology during early postnatal development and provide a simple and reliable method to evaluate spermatogonial development in immature life under adverse circumstances, such as experimental or pathological conditions.

## Materials and Methods

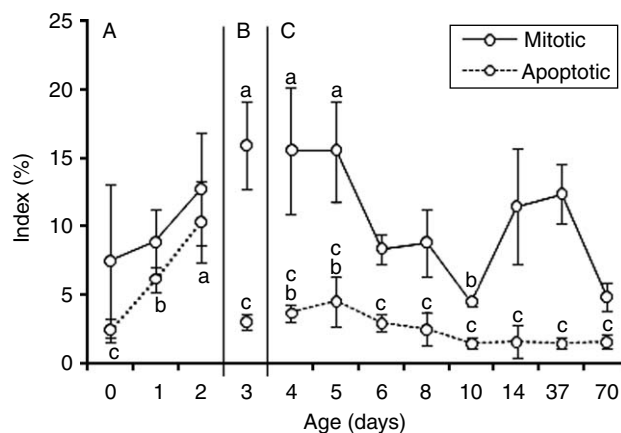
### Animals and histological procedures

Testes from mice of the C57BL/6 strain at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 28, 37, and 70 days *pp* were collected (day 0 was birth date). We used four mice per group. Mating pairs were randomly provided by Federal University of Minas Gerais mouse colony and were bred by investigators. Pups for each age group were generally chosen for the different groups from different litters. This study was previously approved by the ethics committee in Animal Experimentation from the Federal University of Minas Gerais.

After measurement of body weight, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg body weight) via *i.p.* injection and testes were fixed by immersion or perfusion. Animals from 0 to 14 days of age had their testis removed, weighed, and fixed by immersion in 5% glutaraldehyde (biological grade; EMS, Hatfield, PA, USA) and in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4). After an initial fixation for 30 min, the tunica albuginea was removed and the fixation period was extended for 24 h more at 4 °C. The testes were cut into thin slabs of  $\sim 1$  mm thickness and kept in the same buffer, at 4 °C, until embedding. Animals older than 17 days of age were fixed by perfusion via the cardiac route as described previously (Chiarini-Garcia & Meistrich 2008). Heparin was injected *i.p.* (130 U/100 g body weight) 15 min before anesthesia. After that, saline was initially perfused to clear the blood from testis, followed by 5% (v/v) glutaraldehyde in a 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4). Then, the right and the left testes were removed and sliced transversely into small slabs that were also kept in 0.05 M cacodylate buffer, at 4 °C, until embedding. Fragments of both testes, randomly chosen from all mice, were post-fixed in a 1% (w/v) osmium tetroxide and 1.25% (w/v) potassium ferrocyanide mixture, dehydrated in a graded series of ethanol, infiltrated, and embedded in Araldite 502 (EMS). Sections (1  $\mu$ m thick) were obtained from the resin blocks and were stained with toluidine blue-borate for high-resolution light microscopic studies.

### Morphological analysis

The main goals of the morphological evaluations of the gonocytes and spermatogonia during testis development were 1) to identify the cellular features, comparing them with those described in adult mice by Chiarini-Garcia & Russell (2001), 2) to identify the most advanced germ cell type at each age evaluated, and 3) to determine whether spermatogonia from type  $A_1$  spermatogonia up to type B spermatogonia have the same strict associations as those described in adult animals regarding the seminiferous epithelial cycle. Cellular characterization was based on nuclear features such as shape of the



**Figure 7** Mitotic and apoptotic indexes of gonocytes (A), gonocytes mixed with spermatogonia (B), and spermatogonia (C), during testis development. Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Different letters represent significant difference between different ages ( $P < 0.05$ ).

nucleus, presence, and arrangement of heterochromatin, granularity of euchromatin, and morphology and degree of nucleolar compaction.

### Morphometrical procedures

Morphometrical studies were performed to obtain the absolute number of different subtypes of gonocytes and different spermatogonial types ( $A_{undr}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In, B) per testis for all ages studied. For this purpose, the following parameters were obtained:

volume of testicular parenchyma –  $V_T$  ( $\mu\text{m}^3$ )  
 volume density of seminiferous epithelium –  $V_{V_e}$   
 absolute volume of seminiferous epithelium –  $V_{t_e}$  ( $\mu\text{m}^3$ )  
 nuclear volume density of each spermatogonial subtype –  $V_{V_n}$   
 absolute total nuclear volume of each spermatogonial subtype –  $V_{t_n}$  ( $\mu\text{m}^3$ )  
 nuclear volume of each spermatogonial subtype –  $V_n$  ( $\mu\text{m}^3$ )  
 cellular number/testis – CN ( $10^6$ ).

The weight of testicular parenchyma is the testis weight without the tunica albuginea weight. As the testicular density is  $\sim 1$  g/ml (1.03–1.04; Sinha-Hikim *et al.* 1988), each gram of testis corresponds to a volume of  $10^{12}$   $\mu\text{m}^3$ . Hence,  $V_T$  is obtained multiplying the testicular parenchyma weight (g) by  $10^{12}$   $\mu\text{m}^3$ .

The volume density of the seminiferous epithelium was estimated using the point counting method (Sinha-Hikim *et al.* 1988, Russell *et al.* 2002). These data were obtained through an Olympus BX-41 light microscope with a 40 $\times$  objective and using a square lattice containing 441 intersections in a 10 $\times$  eyepiece. We counted  $\sim 4410$  intersections on the seminiferous epithelium and the rest of testicular parenchyma, distributed in ten randomly selected fields per animal (two to three fields per histological section), for each age studied. The volume density of seminiferous epithelium ( $V_{V_e}$ ) was obtained dividing the sum of the points falling on seminiferous epithelium by the total number of points over the tissue. The volume of seminiferous epithelium ( $V_{t_e}$ ) was estimated as follows:

$$V_{t_e} = V_T \times V_{V_e}.$$

The nuclear volume density of gonocytes and each spermatogonial subtype was also estimated using point counting, applying the same 441 square lattice with a 100 $\times$  objective. In 40 randomly selected fields for each animal (four to five fields per histological section), the intersections over the nuclei of each cell type were recorded. The nuclear volume density of each spermatogonial subtype ( $V_{V_n}$ ) was obtained by dividing the sum of the points falling on each cell subtype by the total points over the seminiferous epithelium. The total volume of each germ cell subtype ( $V_{t_n}$ ) was estimated as follows:

$$V_{t_n} = V_{t_e} \times V_{V_n}.$$

To calculate the nuclear spermatogonial volumes ( $V_n$ ), it is necessary to first determine the nuclear diameter ( $D$ ). The diameter of ten nuclei of each germ cell subtype was measured for each animal, using a ruler fitted in a 10 $\times$  eyepiece,

calibrated with a micrometer ruler. For each spermatogonial cell type, the nuclei that appeared to have the largest profiles were selected to be measured, because that indicates that the sections were close to the center of the nucleus. The volume was calculated as:

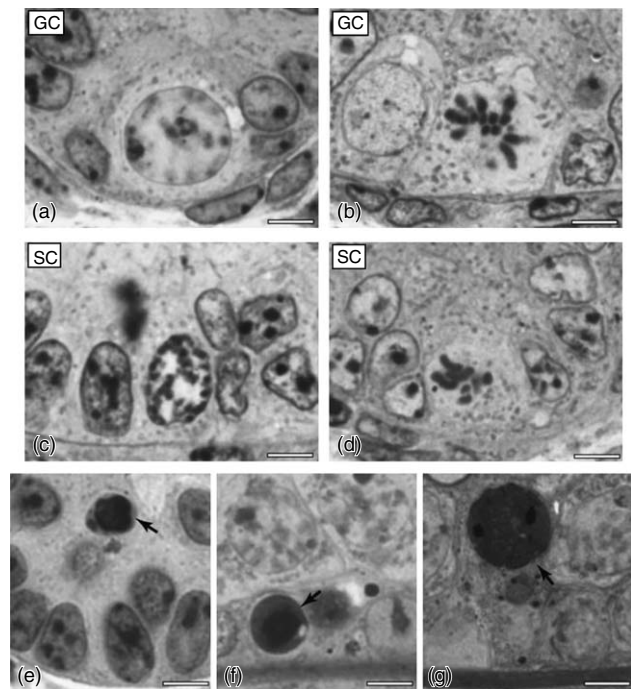
$$V_n = \frac{\pi D^3}{6}.$$

After the determination of the total volume of each germ cell subtype ( $V_{t_n}$ ) and the spermatogonial nuclear volumes ( $V_n$ ), it was possible to calculate the absolute cell number (CN), in millions ( $10^6$ ), for each spermatogonial type per testis as follows:

$$\text{CN} = \frac{V_{t_n}}{V_n}.$$

### Mitotic and apoptotic indexes of gonocytes and spermatogonia

To calculate the mitotic and apoptotic indexes, the following components of the seminiferous epithelium were counted: a) the number of gonocytes and spermatogonia, b) the number of mitoses, and c) the number of apoptotic gonocytes and spermatogonia. Approximately 30 tubular cross sections were



**Figure 8** Morphological features of mitotic phases of germ and Sertoli cells in neonatal testes: panels (a) and (c) represent prophase, and panels (b) and (d) represent metaphase. GC, germ cells (a and b) and SC, Sertoli cells (c and d). Morphological features of apoptotic germ cells: panel (e) represents a seminiferous cord at 3 days *pp*, with an apoptotic gonocyte in the center (arrow), panel (f) represents an apoptotic spermatogonium (arrow), located close to the basal membrane, and panel (g) represents apoptotic spermatocyte (arrow). Bars represent 5  $\mu\text{m}$ .

counted per animal. The mitotic and apoptotic indexes were calculated by dividing the number of mitoses and/or apoptotic cells, respectively, by the sum of gonocytes, spermatogonia, mitoses, and apoptosis.

Specific criteria were needed to distinguish the mitotic spermatogonia from mitotic Sertoli cells. In prophase, the two cell types were clearly distinguished, as they still have the nuclear characteristics of the cells in interphase (Fig. 8a and c), whereas in other mitotic phases, the mitotic spermatogonia were distinguished from mitotic Sertoli cells by their cytoplasmic features. The mitotic figures of germ cells were identified by the outline of their cytoplasmic membrane, separating their cytoplasm from the Sertoli cells' cytoplasm, and by the density of their cytoplasm, which was brighter than the Sertoli cells (Fig. 8b). The Sertoli cells in mitosis usually displayed no cytoplasmic membrane delimitation, or an elongated outline, with processes toward the center of the cords/tubules, and their cytoplasmic density was more homogenous with the cytoplasm around it (Fig. 8d).

The identities of the cells that produced the apoptotic bodies were morphologically determined according to the border blebbing and fragmentation of the chromatin (Fig. 8e, f, and g). When the cytoplasm is observed, the following features are considered: a) its shape (elongated in spermatogonia and round in spermatocytes), b) whether it is contacting basal lamina (spermatogonia are in contact with the basal lamina) and c) how it is contacting (flattened in spermatogonia or punctuated in spermatocytes). The nuclei have particular characteristics that enable their assignment to different cell types such as a) shape, b) size, c) position in the cytoplasm, d) granularity of chromosome fragmentation, finely granular in spermatogonia (Fig. 8f) and coarsely granular in spermatocytes (Fig. 8g), e) number of joined apoptosis (normally spermatogonia are alone), and f) the stage of the epithelium cycle where the spermatocytes are larger and usually far from the basal lamina.

### Statistical analysis

The morphometrical data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Groups were compared using ANOVA, followed by Fisher's LSD and Turkey's tests when necessary. The results were considered to be statistically significant if  $P < 0.05$ . All analyses were performed using SPSS 15.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

### 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 supported in part by the following Brazilian Foundations: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

### Acknowledgements

We thank Maria Luiza da Silva and Adriano Moreira Ferreira for assistance in histological preparation.

### References

- Bolden-Tiller OU, Chiarini-Garcia H, Poirier C, Alves-Freitas D, Weng CC, Shetty G & Meistrich ML** 2007 Genetic factors contributing to defective spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (*Utp14b/jsd*) mice. *Biology of Reproduction* **77** 237–246. (doi:10.1095/biolreprod.107.060087)
- Chiarini-Garcia H & Meistrich ML** 2008 High resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *Methods in Molecular Biology* **450** 95–107. (doi:10.1095/biolreprod65.4.1170)
- Chiarini-Garcia H & Russell LD** 2001 High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biology of Reproduction* **65** 1170–1178. (doi:10.1095/biolreprod65.4.1170)
- 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. (doi:10.1530/rep.0.1260669)
- Clermont Y & Trott M** 1969 Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of  $^3\text{H}$ -thymidine and radioautography. *Fertility and Sterility* **20** 805–817.
- Huckins C & Clermont Y** 1968 Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and post-natal life. *Archives d'Anatomie, d'Histologie et d'Embryologie* **51** 343–354.
- Joyce KL, Porcelli J & Cooke P** 1993 Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *Journal of Andrology* **14** 448–455.
- Kluin PM & de Rooij DG** 1981 A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocyte and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *International Journal of Andrology* **4** 475–493. (doi:10.1111/j.1365-2605.1981.tb00732.x)
- Kluin PM, Kramer MF & de Rooij DG** 1982 Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *International Journal of Andrology* **5** 282–294. (doi:10.1111/j.1365-2605.1982.tb00257.x)
- McGuinness MP & Orth JM** 1992 Reinitiation of gonocytes mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats *in vivo* and *in vitro*. *Anatomical Records* **233** 527–537. (doi:10.1002/ar.1092330406)
- McLean DJ, Friel PJ, Johnston DS & Griswold MD** 2003 Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biology of Reproduction* **69** 2085–2091. (doi:10.1095/biolreprod.103.017020)
- Nakagawa T, Nabeshima Y & Yoshida S** 2007 Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Developmental Cell* **12** 195–206. (doi:10.1016/j.devcel.2007.01.002)
- Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE & Yoshida S** 2010 Functional hierarchy reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* **328** 62–67. (doi:10.1126/science.1182868)
- Nascimento HF, Drumond AL, França LR & Chiarini-Garcia H** 2008 Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *International Journal of Andrology* **32** 486–497. (doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00884.x)
- Oakberg EF** 1956 A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy* **99** 391–414. (doi:10.1002/aja.1000990303)
- de Rooij DG & Grootegoed JA** 1998 Spermatogonial stem cell. *Current Opinion in Cell Biology* **10** 694–701. (doi:10.1016/S0955-0674(98)80109-9)
- de Rooij DG & Russell LD** 2000 All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology* **21** 776–798.

- Roosen-Runge EC & Leik J** 1968 Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. *The American Journal of Anatomy* **122** 275–299. (doi:10.1002/aja.1001220208)
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP & Clegg ED** 1990 *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, edn 1. Vienna, IL: Cache River Press.
- Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ & Knudson CM** 2002 Bax dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **66** 950–958. (doi:10.1095/biolreprod66.4.950)
- Shinohara T, Orwing KE, Avarbock MR & Brinster RL** 2001 Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *PNAS* **98** 6186–6191. (doi:10.1073/pnas.111158198)
- Sinha-Hikim AP, Bartke A & Russell LD** 1988 Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biology of Reproduction* **39** 1225–1237. (doi:10.1095/biolreprod39.5.1225)
- Timmons PM, Rigby PW & Poirier F** 2002 The murine seminiferous epithelial cycle is pre-figured in the Sertoli cells of the embryonic testis. *Development* **129** 635–647.
- Vergouwen RPFA, Jacobs SGP, Huiskamp R, Davids JAG & de Rooij DG** 1991 Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction and Fertility* **93** 233–243. (doi:10.1530/jrf.0.0930233)
- Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T & Nabeshima Y** 2006 The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* **133** 1495–1505. (doi:10.1242/dev.02316)

---

Received 19 October 2010

First decision 9 December 2010

Revised manuscript received 25 February 2011

Accepted 26 April 2011

**ANEXO II - TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

# Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells

Ana Luiza Drumond <sup>a, b</sup>, Connie C. Weng <sup>a</sup>, Gensheng Wang <sup>a</sup>, Helio Chiarini-Garcia <sup>b</sup>, Leticia Eras-Garcia <sup>b</sup>, Marvin L. Meistrich <sup>a</sup>

Ana Luiza Drumond: [analuiza.drumond@yahoo.com.br](mailto:analuiza.drumond@yahoo.com.br); Connie C Weng: [cweng@mdanderson.org](mailto:cweng@mdanderson.org); Gensheng Wang: [gwang@lrri.org](mailto:gwang@lrri.org); Helio Chiarini-Garcia: [chiarini@icb.ufmg.br](mailto:chiarini@icb.ufmg.br); Leticia Garcia: [lets\\_eg@yahoo.com.br](mailto:lets_eg@yahoo.com.br); Marvin Meistrich: [mesitrich@mdanderson.org](mailto:mesitrich@mdanderson.org).

<sup>a</sup> Department of Experimental Radiation Oncology, M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, 1515 Holcombe Blvd, 77030, Houston/TX, USA.

<sup>b</sup> Laboratory of Structural Biology and Reproduction, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, 31.270-901, Belo Horizonte/MG, Brazil.

Corresponding author: Ana Luiza Drumond, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, 77030, Houston/TX, USA; Phone: (713) 798-5964; FAX: (713) 798-7418; [analuiza.drumond@yahoo.com.br](mailto:analuiza.drumond@yahoo.com.br).

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Abbreviations: CY, cyclophosphamide; p.o., per oral; i.p., intraperitoneal; GCNA 1, germ cell nuclei antigen 1; Expt., experiment; SHC, sperm head count; HRLM, high resolution light microscopy; PI and preL, preleptotene spermatocytes.

## Abstract

Spermatogenesis is sensitive to the chemotherapeutic drug cyclophosphamide, which decreases the patients' sperm count. Since the recovery of fertility is dependent on regeneration from stem cells, in the present study we designed a cyclophosphamide-regimen to eliminate differentiating germ cells in mouse, and evaluated the ability of cyclophosphamide-exposed stem spermatogonia to regenerate spermatogenesis in situ and after transplantation. Seven doses of cyclophosphamide given at 4-day intervals largely eliminated the differentiating germ cells but left ~50% of the undifferentiated type A spermatogonia. We monitored the recovery and found that sperm production recovered to 64% of control within the time expected. When the cyclophosphamide-surviving spermatogonia were transplanted into recipient mice, the recovery of spermatogenesis from the cyclophosphamide-exposed donor cells was reduced to 12% of that expected, when compared to cryptorchid donors. Thus, multidose regimens of cyclophosphamide did not eliminate the stem spermatogonia, but resulted in cell loss and residual damage.

**Key Words:** cyclophosphamide, mice, spermatogonial stem cells, testis

## 1. Introduction

25

The seminiferous epithelium of the testis is very susceptible to damage caused by toxicants, particularly chemotherapy and radiotherapy used in the treatment of cancer. As a result, young patients cured of cancer often suffer prolonged and sometimes permanent reductions in sperm counts or azoospermia and are infertile.

30

The most sensitive testicular cells to chemotherapeutic drugs and radiation are the ones that are undergoing constant mitotic activity, which are the differentiating spermatogonia [1-3]. The death of these cells results in maturation depletion of later stages of germ cells and reductions in sperm counts.

35

The eventual recovery of sperm production depends on the survival of the spermatogonial stem cells and their ability to differentiate to spermatozoa. In rodents, the spermatogonial stem cells have been identified morphologically as individual isolated cells called A single spermatogonia ( $A_s$ ) [4]. When these cells divide without complete separation of their cytoplasm, they form A paired spermatogonia ( $A_{pr}$ ), which undergo further mitotic divisions, forming a chain of cells known as A aligned spermatogonia ( $A_{al}$ ).

40

Finally, the  $A_{al}$  spermatogonia can form  $A_1$  differentiating spermatogonia, which begin the precisely timed sequence of mitotic divisions and the differentiation process towards the formation of the spermatozoa.

45

If stem cells survive and their microenvironment is not affected, recovery of spermatogenesis will occur rapidly [2]. However, if some spermatogonial stem cells are killed, as occurs with radiation and some chemotherapeutic agents, recovery is more gradual [5,6]. In mice, it was shown that the interval needed for the recovery of fertility is directly proportional to the level of killing of the spermatogonial stem cells. There is also evidence that these agents can produce damage to the somatic tissue, and in rat testes, even though numerous stem spermatogonia survived the cytotoxic treatment, there was no

50

The first methods developed to assess functional damage to the stem cells in the testis relied on quantifying their ability to regenerate spermatogenesis after the toxic insult. These included counts of regenerating tubules or sperm production at the time when the sperm would have been derived from surviving stem spermatogonia [2,9,10]. Although efficient for evaluating damage caused by a cytotoxic agent on the differentiation of stem cells, measurement of these endpoints did not account for possible damage to the somatic microenvironment of the seminiferous epithelium which could reduce the level of germ cell

55



differentiation [8]. More recently, it has been demonstrated that spermatogonial transplantation [11] can be used to assess stem cell numbers and function after cytotoxic treatment, eliminating the possible effects of damage to the endogenous somatic cells. This method was used to determine the decrease in the stem cell number after a single injection of the chemotherapeutic drug busulfan, and the subsequent recovery of stem cell numbers in these mice. Spermatogonial transplantation has also been combined with assessment of undifferentiated A spermatogonia to demonstrate stem cell ablation by busulfan in rhesus monkeys [12].

One chemotherapeutic drug that is widely used for cancer treatments and immunosuppression for nephrotic disorders is cyclophosphamide (CY). This drug causes reduction in patients' sperm counts during treatment. Recovery from moderate doses of CY is possible, sometimes after a prolonged period of azoospermia; however high doses of CY cause permanent azoospermia in humans [13,14]. To better elucidate the action of CY on spermatogonial stem cell survival and the subsequent recovery of spermatogenesis, studies using experimental animal models systems are needed.

In mice, Lu and Meistrich [2] have studied the comparative effects of single injections of several different chemotherapeutic drugs, given as single doses, on spermatogenesis. One 200-mg/Kg dose of CY totally eliminated differentiating spermatogonia ( $A_2$  stage and later) and early preleptotene spermatocytes and this resulted in a decline in testicular sperm count 29 days after treatment. In contrast the undifferentiated A spermatogonia, which include the spermatogonial stem cells, did not appear to be affected by this treatment and testicular sperm count was completely recovered 56 days after treatment.

Similar results were observed in rats. A single injection of CY induced a peak of apoptosis among basally located germ cells within 1 day, primarily in stages where  $A_4$  to intermediate spermatogonia were present [15]. However even high doses CY resulted in very little spermatogonial stem cell killing as evidenced by recovery of sperm counts 9 weeks after injection [16].

Based on the above observations of the high sensitivity of rodent differentiating spermatogonia to CY but the relative resistance of the stem cells, one of the initial goals of the present study was to use multiple doses of CY to eliminate most of the later germ cells and produce an enriched population of mouse stem spermatogonia. We determined if the stem cells left in the epithelium were functional in situ, by showing endogenous recovery of spermatogenesis in the treated host. Finally, after the isolation of a pool of cells, we used

germ cell transplantation assay to assess the functional ability of treated stem cells, and determine whether the recovery in the recipient mice is compatible with the results in situ.

## 95 **2. Materials and Methods**

### *2.1. Animals and treatments*

Male mice of the C57BL/6Law strain were used unless otherwise noted. Animals were treated at approximately 8 weeks of age. All procedures were approved by the M. D. Anderson Cancer Center Institutional Animal Care and Use Committee.

Animals received injections of CY (Cytoxan, Bristol-Myers Squibb Co, Princeton, NJ) through oral (p.o., 22G gavage needle) or intraperitoneal (i.p) administration. Control animals received saline injections. Several experiments were performed to examine effects of different treatment protocols

105 In Experiment 1, mice were treated with a single injection of CY (Fig. 1). Animals received single doses of CY at 150 mg/Kg or 200 mg/Kg, either p.o. or i.p.. Animals were euthanized at 1, 2, 3, 11 and 28 days after administration of the drug, and various parameters were evaluated for each endpoint.

110 In Experiment 2, mice were treated with six doses of CY, at a dose of 150 mg/Kg each. The drug was given at 5-day intervals (Fig. 1), through both the p.o. and i.p. routes, over a period of 25 days. Animals were euthanized on days 28, 59, 62, 65, 70 and 81 (3, 34, 37, 40, 45, and 56 days after the last injection). The specific time points were chosen based on the time intervals for the different cell types to produce testicular sperm [2,4] (Table 1).

115 In Experiment 3, mice were treated with seven doses of CY, given p.o. at 150 mg/Kg each. The drug was given with 4-day intervals between doses (Fig. 1), over a period of 24 days. Animals were euthanized on days 28 and 80 (4 and 56 days after last injection, respectively).

120 For the transplantation assay, male C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) mice expressing green fluorescent protein (GFP; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were used as donors. Four groups of donors were used: 1) young, 14- to 16-day old mice; 2) untreated adult 8-week old mice; c) surgically cryptorchid adult mice, and 4) adults treated with CY.

125 The adult cryptorchid mice were 8 weeks old at the time of the surgery, and had their testicles raised by suturing the epididymal fat pad to the upper portion of the lateral abdominal wall [17] for 8 weeks prior being used as donors for the transplantation

experiment. Only testicles that weighed less than 30 mg at the time of harvest and appeared healthy (no sign of necrosis) were used for the cell suspension.

Adult CY-treated mice were 8 weeks old at the beginning of the treatment. Mice received CY at a dose of 150 mg/Kg p.o., administered every 4 days over a 24-day period (as in Experiment 3). These animals were used as donors for transplantation 4 days after the last injection of CY.

Recipient animals were male C57BL/6Law mice, at approximately 8 weeks of age, treated with 2 doses (1.5 +12 Gy) of ionizing radiation separated by 24 hours [21]. They were used for transplantations 3 to 4 weeks after irradiation.

135

## *2.2. Histology and morphological analysis*

Testes were weighed, fixed with Bouin's solution and embedded in paraffin or glycol methacrylate resin. Blocks were sectioned at 5  $\mu$ m thickness, and sections were stained with periodic acid-Schiff's (PAS) and hematoxylin.

For animals evaluated 11 days after injection, tubular cross-sections were scored to determine the stage of the seminiferous epithelial cycle, and whether the layers of cell types ( $A_4$  spermatogonia to zygotene, pachytene to meiosis, and round to step 12 spermatids) were present in normal amounts ( $>20$  in the case of spermatocytes or spermatids), appreciably reduced (6 to 20), nearly completely absent (1 to 5) or absent (0). After scoring, we were able to calculate the cell types affected by the drug, at the moment of injection 11 days before the analysis, by back-calculation based on the kinetics of germ cell development [2].

In order to distinguish the spermatogonial types in the testes, samples were prepared for high resolution light microscopy [18,19]. Thus, animals were perfusion-fixed with 5% glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4). Testes were removed, weighed and sliced in small slabs. Fragments were post-fixed in osmium tetroxide/potassium ferrocyanide mixture and embedded in Araldite 502 (EMS, Hatfield, PA). One- $\mu$ m thick sections were obtained from the resin blocks and were stained with toluidine blue-borate for light microscopy studies.

Morphometric studies were performed to obtain the numbers of each different spermatogonial type ( $A_{und}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In, B), preleptotene spermatocytes, meiotic spermatocytes, and spermatids per 100 Sertoli cells present in seminiferous tubule cross sections; the Sertoli cells were only counted when the nucleolus was observed.  $A_{und}$  are undifferentiated type A spermatogonia and include the single, paired, and aligned cells.

155

160 Approximately 30 tubular cross sections were counted per animal, using multiple  
fragments from both testes. The numbers of each germ cell type, and Sertoli cells was  
corrected using the Abercrombie formula [20], using the average nuclear diameter of each  
cell type, calculated after measuring 10 cells, and the average Sertoli cell nucleoli  
diameter, also calculated after measuring 10 nucleoli.

165

### *2.3. TUNEL staining for apoptosis*

The testes were fixed with Bouin's solution and embedded in paraffin. Five- $\mu$ m  
sections were obtained and stained with the TUNEL reaction (DeadEnd™ Colorimetric  
TUNEL system, Promega, Madison, WI) to identify apoptotic cells, followed by  
170 PAS/hematoxylin staining.

For those animals analyzed 1 to 3 days after one dose of CY (Expt. 1), the stage of  
the cycle of the seminiferous epithelium was determined. Only the TUNEL-positive cells  
found adjacent to the basal membrane were counted, and these cells were consistent with  
the morphology of spermatogonia or preleptotene spermatocytes. Approximately 10  
175 tubular cross-sections were counted per stage, and the percentage of tubules with TUNEL-  
positive cells was calculated for each stage.

For animals assayed 3 days after receiving the last of six doses of CY (Expt. 2),  
staging was not possible and the spermatogonial apoptotic index was calculated. The  
percentage of spermatogonia undergoing apoptosis was calculated by dividing the number  
180 of TUNEL-positive spermatogonia by the total number of spermatogonia counted.  
Approximately 30 tubular cross-sections were counted per animal.

### *2.4. Sperm head count*

For sperm head count [10], the right testis was weighed with the tunica albuginea  
185 intact, and placed in 1 ml distilled water. The contents were homogenized, for 30 seconds  
with a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Westbury, NY), keeping the  
samples on ice. After homogenization, the samples were sonicated for 4 minutes, in a cold  
water bath using a Branson Sonicator (Heat Systems, Ultrasonic, Plainview, NY). Sperm  
heads were counted in a hemacytometer with a 40x objective and phase contrast optics.

190

## 2.5. Transplantation

195 To obtain the cell suspensions from the testis, the animals were anesthetized and  
the testicles were collected and weighed. Donor cell suspensions were obtained by  
successive enzymatic digestions of GFP mice testes in a 35°C water bath [21], and  
filtration of the solution obtained through a 40 µm nylon filter. The final germ cell  
suspensions were adjusted to concentrations of between 2 and 6 x 10<sup>7</sup> per ml prior to  
200 injection into the recipient testes. Approximately 10 µL of the donor cell solution was  
injected through the efferent ducts.

The recipient animals were euthanized 8 weeks after transplantation and their  
testes were fixed with 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Serial sections 5  
µm thick, were obtained and immunohistochemistry for germ cell nuclei antigen 1 (GCNA1,  
205 rat monoclonal IgM anti-mouse GCNA1, a gift from Dr George Enders) and green  
fluorescent protein (GFP, rabbit polyclonal anti-GFP; Cat #2956; Cell Signaling, Danvers,  
MA) was performed using the ABC Elite kit, appropriate secondary antibodies, and  
diaminobenzidine (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to the manufacturer's  
protocol. Sections were counterstained with hematoxylin. The percentages of tubules with  
210 colonies derived from endogenous stem cells (GFP-negative) and from donor stem cells  
(GFP-positive) were counted in about 30 tubular cross-sections per testis. For comparison  
between different donor types, the percentages of tubule cross-sections with donor-derived  
colonies found in each testis were normalized to the average numbers of cells injected.

## 2.6. Statistical analysis

215 Data are expressed as mean ± standard error. Groups were compared using  
ANOVA, followed by Fisher's LSD or Turkey's tests when appropriate. Differences were  
considered to be significant when p<0.05. All analyses were performed with SPSS 15.0  
software (SPSS Inc. Chicago, IL).

220

## 3. Results

### 3.1. Effects of a single dose of cyclophosphamide

225 Initial experiments were performed to characterize the effects of single injections of  
cyclophosphamide (Expt. 1, Fig. 1). With both gavage and i.p administration of either 150  
or 200 mg/Kg there was a transient loss of body weights 3 days after CY treatment, but

body weights returned to pre-treatment levels by day 7, and were similar to controls thereafter (data not shown).

230 Detailed analysis of cell loss was performed with the 150 mg/Kg dose administered p.o. The TUNEL analysis revealed that CY increased the incidence of apoptotic cells 1 and 2 days after administration (Fig. 2). These increases were observed, especially in tubules in stages II-VII of the cycle of the seminiferous epithelium which contain intermediate or B spermatogonia and preleptotene spermatocytes, which means that the cells that were A<sub>4</sub> to B spermatogonia at the time of injection were sensitive to induction of  
235 apoptosis. These are the stages during which the largest numbers of mitotically active spermatogonia are present in the testis. The apoptosis returned to the basal level on the third day after injection, indicating that the cells that underwent apoptosis were cleared from the tissue during the first two days after exposure to CY.

240 At 11 days after injection, most tubules showed partial or complete absence of spermatocytes in meiotic prophase (Fig. 3B). Pachytenes were completely absent from stages IV to IX, and nearly completely absent in stages I to III and stage X (Fig. 4A). Zygotenes and early pachytenes in stage XII were markedly reduced. Back-calculation based on the kinetics of spermatogenesis (Fig. 4B) revealed that this dose of CY specifically killed the differentiating spermatogonia A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>, In and B spermatogonia and the  
245 newly formed preleptotene cells, with the A<sub>4</sub> to B spermatogonia being the most sensitive. Both earlier (A<sub>und</sub> spermatogonia) and later stage cells (spermatocytes in meiotic prophase), did not appear to be appreciably affected by this dose. These results agree with the analysis of apoptotic cells showing that the spermatogonia that are undergoing active proliferation and mitotic divisions are the main target of CY cell killing.

250 In order to evaluate the relative effectiveness of different doses and routes of administration in depletion of differentiating spermatogonia (types A<sub>1</sub>-B) mice were treated with single doses of CY, of either 150 mg/Kg or 200 mg/Kg, both given p.o. and i.p. and spermatogenesis was evaluated 28 days later. This is the time point at which late spermatids would be derived from the surviving spermatogonia.

255 Histological analysis of the seminiferous epithelium (Fig. 3C), 28 days after injection with 150 mg/Kg p.o., showed that the spermatogonia, spermatocytes, and early spermatids regenerate quite well from surviving undifferentiated spermatogonia. Although it was common to see appreciable numbers of elongating and condensing spermatids in tubules at stages IX-XII, most of late elongated spermatids are absent (stages II-VIII). In  
260 contrast, with treatments using 200 mg/Kg p.o. and 150 or 200 mg/Kg i.p., most of the

tubules at stages IX-XII had reduced numbers of elongating and condensing spermatids (Fig. 3D). These results are consistent with the moderate 30% losses in testis weights observed (Table 2). In addition, the testis weight data showed that intraperitoneal injections of CY seemed to be slightly more effective at reducing the numbers of recovering cells than did gavage administrations.

The testicular sperm head counts (Table 2) revealed a large decrease in the numbers of sperm heads present in treated animals. Treatment with 150 mg/Kg p.o. produced a 10-fold decline in sperm counts. Treatments with 200 mg/Kg by both routes and 150 mg/Kg i.p produced about 15-fold declines.

### 3.1.2 Acute effects of multiple injections of cyclophosphamide

In order to develop a protocol using the minimal dose to eliminate as many of the differentiating germ cells as possible, mice were treated with multiple injections of CY to kill the differentiating spermatogonia as they developed. Animals received 6 doses with a 5-day interval between injections over a span of 25 days, through either the p.o. or i.p. routes (Expt. 2, Fig. 1), or with 7 doses p.o. with a 4-day interval (Expt. 3). There were minor toxic effects of the p.o. administration as the mice lost  $0.7 \pm 0.2$  g body weight with the 5-day intervals and  $0.9 \pm 0.4$  g with the 4-day interval, compared to a  $1.9 \pm 0.4$  g weight gain in sham-treated controls. However there was more severe toxicity in those treated i.p. as there was a  $2.3 \pm 0.2$  g loss of body weight.

All of the multiple injection regimens caused more severe depletion in the seminiferous epithelium than did the single dose treatments. The testis weights in animals treated with multiple doses, 28 days after the first injection, were about 30 mg compared to 60-68 mg with single doses (Table 2).

Histological analyses showed major depletion of the seminiferous epithelium 28 days after first injection (Fig. 5C). At this time point there was severe seminiferous tubular atrophy with all three treatment regimens. There was a very dramatic reduction of most spermatocytes and spermatids, although a few could still be observed. In addition, there were some differentiated spermatogonia (Fig. 5D) that survived or recovered from earlier stage spermatogonia in the 3 days from the last injection, as well as undifferentiated spermatogonia (Fig. 5F) that had the same morphology as those from control animals (Fig. 5E). Nearly all of the spermatogonia appeared normal and viable, only 2.4% were undergoing apoptosis, which was similar to the percentage in control animals. Thus any

apoptosis that was induced by the last CY injection 3 days previously had been completed,  
295 consistent with what was observed after a single injection of CY.

Quantitative counts of cells from the histological material showed that, at 28 days,  
all multidose regimens produced large decreases in the numbers of differentiating  
spermatogonia, spermatocytes and spermatids (Fig. 6). Analysis of the numbers of  
differentiating cells following the 6-dose/ 5-day interval regimens showed that, when given  
300 p.o., there were still some intermediate spermatogonia to preleptotene spermatocytes (7%  
of control), meiotic spermatocytes (5% of control), and spermatids (4% of control) present.  
However, numbers of these cells were effectively reduced to about 1% of control by giving  
the same dose i.p., or giving 7 doses p.o. with a shorter interval.

In contrast to the large decreases of the numbers of differentiating germ cells, there  
305 was at most a small effect of multiple doses of CY on the numbers of undifferentiated type  
A spermatogonia (Fig. 5F and Fig. 6). There was no effect of giving 6 doses of CY p.o. at  
150 mg/Kg with a 5-day interval on these cells. There were trends towards reductions in  
undifferentiated type A spermatogonial numbers with i.p. injection or the 7-dose/ 4-day  
interval p.o. treatment, and they were at most about 50%. Although the treatments with  
310 150 mg/Kg i.p. (5-day intervals) and with 150 mg/Kg p.o. (4-day intervals) produced very  
similar germ cell counts, the i.p. regimen produced a greater weight loss during treatment,  
suggesting this treatment to be more toxic.

### 3.3. *Endogenous recovery of spermatogenesis from surviving stem cells*

315 Since there were remaining stem cells at the end of the treatment, despite the  
nearly complete tubular atrophy, it gave us an opportunity to assess the time course of the  
recovery from this depleted state. The recovery of the seminiferous epithelium after the  
end of treatment was evaluated at different times after the multidose treatment regimens.

Qualitative histological analysis performed 56 days after the last injection (80/81  
320 days after the first injection), when the surviving stem spermatogonia should be producing  
spermatozoa, showed recovery of most of the seminiferous epithelium (Fig. 5G), although  
there were still some damaged seminiferous tubules, deficient in germ cells, for all  
treatment regimens.

The recovery of spermatogenesis was quantified by measurements of testis weight  
325 and sperm head count (Fig. 7). Both parameters steadily increased after the end of the  
treatment. At 56 days after the last injection among the animals receiving 6 treatments at  
5-day intervals, those receiving i.p. injections only reached testis weights and sperm head



counts that were 70% and 40% of control, respectively, whereas those receiving p.o. administration had significantly greater recoveries reaching 80% and 64% of control, respectively. It was noted that none of the treated animals had reached the values measured for control animals. Thus we conclude that recovery of spermatogenesis following p.o. treatment, although incomplete, is better than after i.p. treatment. The lower recovery after i.p. injections, despite the equivalent numbers of  $A_{und}$  spermatogonia, might be due to additional damage to the spermatogonia, to the testicular tissue, and to extratesticular targets affecting spermatogenesis.

Comparing the p.o. treatments, 7 administrations given 4 days apart (Fig. 1, Expt 3) showed recovery of testis weight to 74% of control, observed 56 days after the last injection (80 days after first injection), lower than those receiving 6 treatments at 5-day intervals. However, the numbers of sperm produced, which should be more directly a measure of recovery of spermatogenesis from the surviving stem cells, at this time point were approximately the same (64% of control) (Fig. 7B); therefore the surviving stem cells seem to be effectively differentiating even after the more intense treatment regimen.

#### 3.4. Functional evaluation of cyclophosphamide-treated stem cells

Next we tested whether the stem cells that survived CY treatment, and were able to produce recovery of spermatogenesis *in situ* in the host testis, were fully functional after germ cell transplantation. For this purpose, the animals were treated with 7 doses of 150 mg/Kg p.o. with 4-day intervals between injections, which we found to be the most efficient treatment for eliminating differentiating germ cells, with only limited toxicity, and a seemingly modest effect on the numbers of undifferentiated type A spermatogonia. We compared the efficiency of transplantation with known donor models of spermatogonial transplantation, including prepubertal mice and cryptorchid mice, which have a high reported concentrations of stem cells, and untreated adult mice, which have a low reported concentration of stem cells.

To obtain a prediction of the relative numbers of stem cells in the cell suspension, we counted the numbers of different types of germ cells in the prepubertal, adult, cryptorchid, and CY-treated testes (Fig. 8). The total numbers of type A undifferentiated spermatogonia per Sertoli cell were not significantly different among all the adult groups, but were lower for adult mice treated with CY than for young animals. The adult mice had the highest numbers of later spermatogonia (In and B) and preleptotene spermatocytes and very high numbers of spermatocytes and spermatids. The cryptorchid B6 mice showed

significantly reduced numbers of In spermatogonia to preleptotene spermatocytes and 3- to 4-fold reductions in the numbers of later germ cells, such as spermatocytes and spermatids. However, we have rarely been able to achieve the complete loss of these differentiated cells as reported by Nishimune and Aizawa [17]. Immature mice had nearly as many spermatogonia per Sertoli cells as the adult but lower numbers of spermatocytes and no spermatids. The CY-treated mice had the lowest number of differentiating germ cells at all stages and very markedly reduced numbers of cells from the intermediate spermatogonia through spermatids. These results taken together demonstrate that the percentage of germ cells that were of type  $A_{und}$  spermatogonia was highest for CY animals (Fig. 8), because these animals had fewer differentiated germ cells than all the other three groups. However, if we include Sertoli cells, which would also be in the cell suspension in the counts, the percentage of cells that are  $A_{und}$  is highest for the young animals but still would be next highest for the CY-treated ones.

The number of cells obtained per testis from mice treated with CY, after the cell suspension preparation, was similar to what was observed for cryptorchid animals, but was lower than the numbers observed for young and adult animals (Table 3). We injected similar numbers of cells from the cell suspensions (Table 4), obtained from animals of each of the four groups, through the efferent ducts, in order to produce colonization of recipient testis after transplantation.

Histological analysis of the testes of recipient animals (Fig. 9) harvested 8 weeks after transplantation were performed by immunostaining for GCNA-1, in order to detect differentiation of the germ cells, and for GFP, to distinguish endogenous and donor colonies, among the GCNA-1-positive tubular cross-sections. There was recovery of spermatogenesis from endogenous stem cells in about 3 to 4% of the tubules of recipient animals with no significant differences between animals transplanted with cells from the different donor groups. Donor cells from all sources used were capable of colonizing the recipient testis and to differentiate, forming elongated spermatids (Fig. 9B, D, F and H); there were no apparent differences in the stages of differentiation or the quality of colonies produced between the different donor animals. The percentages of tubules that contained GFP positive colonies (donor derived) were assessed and normalized based on the numbers of cells injected in each group during the transplantation (Table 4). The results showed that the prepubertal mice and adult cryptorchid mice had the highest concentrations of functional stem cells in their testes. Despite the higher concentration of  $A_{und}$  spermatogonia and presumably stem cells present in their cell suspensions (Fig. 8),

cells from CY-treated donors resulted in significantly lower levels of colonization than did those from cryptorchid mice. These results suggest that the loss of functional stem cells might have been greater than what the in situ recovery suggested or that there was functional damage to the stem spermatogonia caused by CY so that the numbers of  $A_{und}$  are not a good measure of functional stem cells. Nevertheless, the cells from CY-treated mice still appeared to show greater colonization than did those from untreated adult mice.

#### 4. Discussion

In the present study we developed a multidose regimen of treatment with CY capable of depleting the differentiated cells in the testis, while maintaining the population of undifferentiated spermatogonia, which includes the stem cell population. We were able to find a balance of dose, route of administration, and interval between doses, that eliminated a wide window of cells, from differentiating spermatogonia to late spermatids, with minimal animal toxicity, and still allowing survival of an appreciable number of undifferentiated spermatogonia and apparent good recovery of spermatogenesis from surviving spermatogonial stem cells. This regimen reduced the numbers of differentiated cells to 1% of control but left ~50% of the undifferentiated type A spermatogonia remaining. The enrichment of undifferentiated spermatogonia by CY-treatment could potentially be used as an initial step in the purification of these cells for further molecular characterization of the effects of CY on them.

These results are consistent with and extend other studies in the literature on rodents showing the sensitivity of differentiating spermatogonia but relative resistance of stem cells to a wide variety of CY regimens [2,15,22-24]. This is in contrast to some other chemotherapeutic drugs, such as busulfan, doxorubicin, thiotepa, and procarbazine that effectively kill the stem spermatogonia as well as differentiating spermatogonia [2,25-27].

The presence of healthy looking  $A_{und}$  spermatogonia at the end of the treatment regimen is the source of the subsequent recovery of spermatogenesis in the treated testes. Already at 45 days after last injection, before the surviving  $A_s$  had time to go through further self-renewal divisions and still produce late spermatids, the sperm produced from these stem cells were at approximately 63% of the control levels.

Despite the survival of the stem cells and their active function for recovery of spermatogenesis in situ in the testis, these cells seemed to have some loss of function when assayed by transplantation. Notwithstanding the fact that the CY-treated testis had

430 the highest concentration of  $A_{und}$  cells as a percentage of germ cells, the ability of the stem  
cells to produce colonies upon transplantation of a given number of cells was only 16% of  
that of the suspensions from immature testes and 32% of that from cryptorchid testes.  
Concerning the results observed for young mice as donors, it may be difficult to  
quantitatively compare with the CY-treated as the yield of cells was much higher per mg-  
435 testis for the young animals. That could occur because the Sertoli cells are still immature  
and have not yet established the tight junctions facilitating the recovery of these cells and  
the basally located spermatogonia in suspension. Inclusion of immature Sertoli cells in the  
suspension that was transplanted could possibly provide additional niche function for  
development of spermatogenesis [28,29], although we were not able to detect GFP-  
440 stained Sertoli cells in the recipient mice.

However comparisons can be made between the cryptorchid and CY-treated animals  
as they appear to be very similar in many respects. The testis weights and yields of cells  
per testis were the same for both groups and the numbers of  $A_{und}$  per Sertoli cell were  
similar. Since both models were derived from treating already adult mice, the somatic cell  
445 types and structure should be largely the same. Yet although the percentage of germ cells  
that were  $A_{und}$  spermatogonia was ~7 times higher in the CY-treated animals than in the  
cryptorchid ones, the number of tubules with colonies generated by CY treated donors was  
only 32% of the colonization promoted by cryptorchid cells. Although the initial collagenase  
digestion resulted in the removal of most of the interstitial cells, and loss of many Sertoli  
450 cells during the digestion of tubules [30], some of these cells might be present in the  
suspension. Even if all of the Sertoli cells were recovered in the suspension, the  
concentration of  $A_{und}$  spermatogonia would still be 2.6-fold higher in the suspensions from  
the CY-treated mice than from the cryptorchid ones, and we expected at least 2.6 times  
the number of stem-cell derived colonies upon transplantation. Thus the 32% yield of  
455 colonies from the CY-treated mice compared to the cryptorchid donors is only 12% of  
expectation, further supporting the conclusion that the stem cells from the former were  
functionally impaired.

There is general agreement that the stem cells are contained within the population of  
 $A_{und}$  spermatogonia. There is one report in the literature that c-kit-positive spermatogonia  
460 are capable of colonizing recipient testes [31], implying that these must be differentiated  
spermatogonia. If this were true, then the reduced number of differentiated spermatogonia  
in the CY-treated mice could possibly account for the lower transplantation efficiency.  
However, c-kit expression begins in late stage  $A_{al}$  [32] so the colonization ability of the c-kit

positive cells could be due to  $A_{al}$ , which are undifferentiated spermatogonia, or possibly  
465 early stage differentiated type A cells. However the numbers of  $A_1$  spermatogonia are not  
reduced by the CY-treatment (data not shown), so this cannot explain the lower colonizing  
ability of the cells from CY-treated mice.

The histology method we used, high-resolution light microscopy of tissue sections,  
permits identification of the  $A_{und}$  spermatogonia but does not show their chain sizes or  
470 provide other markers. The stem cell pool that contributes to steady state spermatogenesis  
is largely contained within a subpopulation of  $A_s$  spermatogonia, however the  $A_{pr}$  and  $A_{al}$   
can occasionally contribute to the stem cell pool by fragmentation [32]. These chains are  
considered to be potential stem cells and contribute more markedly to the self-renewing  
stem cells during recovery from cell depletion, as occurs after treatment with a  
475 chemotherapy agent such as busulfan or after transplantation [33]. Although we have not  
determined the distribution of  $A_s$ ,  $A_{pr}$ , and  $A_{al}$  within these  $A_{und}$  spermatogonia, we can  
conclude that the percentage of these that are stem cells should be at least as high as in  
the untreated testis. Since this treatment involves 7 CY doses, the presence of appreciable  
numbers of  $A_{pr}$  and  $A_{al}$  cells, which constitute the bulk of the  $A_{und}$  population, at 4 days after  
480 the last treatment indicates that their progenitors, the stem cells, must have survived the  
first 6 injections and hence should have survived the seventh injection. The lower  
colonizing efficiency of cells from the CY-treated mice than from the cryptorchid mice may  
reflect differences within the  $A_{und}$  compartment. Further studies characterizing the clone  
size and stem and differentiation markers in the surviving  $A_{und}$  population from cryptorchid  
485 and CY-treated mice might further elucidate reasons for the differences in stem cell  
functional abilities.

It is also possible that each CY-treatment is killing a fraction of the stem cells, but the  
loss is compensated by increased clone fragmentation and increased self-renewal that  
occurs after cell loss [34]. Sperm production could be maintained after recovery from CY-  
490 treatment, despite killing of stem cells, by increased division of the  $A_{al}$  and reduction of  
differentiated type A spermatogonial apoptosis [35]. Thus the transplantation assay may  
be more directly measuring the loss of surviving functional stem cells, whereas  
endogenous recovery is not sensitive to small to moderate losses in stem cell numbers.  
Thus, the more efficient transplantation from the cryptorchid mice actually reflects higher  
495 numbers of functional stem cells than in the CY-treated mice.

Alternatively it is possible that a high number of functional stem cells are indeed  
present in the CY-treated testes, and although they are functional in situ, they have some

500 damage that affects their ability to colonize an irradiated recipient testis. We have previously shown that the colonization and differentiation ability of donor cells from immature mice were improved in the recipient testis about 6-fold by suppression of testosterone in the recipient mice before and after the transplantation [36]. Therefore, it may be worthwhile testing whether hormone suppression could even more dramatically enhance the functionality of the CY treated stem cells in the recipient testis.

505 In summary, the stem spermatogonia in mice seem to survive multiple doses of CY, and very pronounced in situ recovery is observed. Still there is evidence for some loss of stem cells or residual damage to them when they are isolated from the testis and transplanted, but the specific reason why it occurs still remains to be elucidated. The observation of stem cell loss or damage in CY-treated mice may provide methods for further understanding of the apparently greater sensitivity of the human testis to prolonged azoospermia after CY treatment [14,37].  
510

### Acknowledgements

The present study was funded by the NIH, the Florence M. Thomas Professorship in Cancer Research, and by the program CAPES-UT, established between the University of Texas and the Brazilian agency CAPES. We thank Shan Shao, Nalini Patel and Kuriakose Abraham, from the MDACC, and Maria Luiza Silva, from UFMG, for their technical assistance with histological preparations and immunostaining. We thank Dr G. Enders for kindly supplying anti GCNA1 antibody and Dr R. Behringer for opening his laboratory for making glass pipettes.

### References

- [1] Dym M, Clermont Y. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat* 1970;128:265-82.
- [2] Lu CC, Meistrich ML. Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cell. *Cancer Res* 1979;39:3575-82.
- [3] Kangasniemi M, Veromaa TI, Kulmala J, Kaipia A, Parvinen M, Toppari I. DNA-flow cytometry of defined stages of rat seminiferous epithelium: effects of 3 Gv of high-energy X-irradiation. *J Androl* 1990;11:312-7.
- [4] de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 1998;79:67-80.
- [5] Meistrich ML, Hunter NR, Suzuki N, Trostle PK, Withers HR. Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 1978;74:349-62.

- [6] Meistrich ML. Quantitative relation between testicular stem cell survival, sperm production, and fertility in the mouse after treatment with different cytotoxic agents. *J Androl* 1982;3:58-68.
- [7] Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of A spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod* 1996;54:1200-8.
- [8] Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *J Cell Physiol* 2007;211:149-58.
- [9] de Ruiter-Bootsma AL, Kramer MF, de Rooij DG. Response of stem cells in the mouse testis to fission neutrons of 1 MeV mean energy and 300 kV x rays. Methodology, dose response studies, relative biological effectiveness. *Radiat Res* 1976;67:56-68.
- [10] Meistrich ML, Van Beek M. Spermatogonial stem cells: Assessing their survival and ability to produce differentiated cells. In: Chapin RE, Heindel JJ, editors. *Methods in Toxicology* vol.3A, San Diego: Academic Press Inc; 1993, p. 106-23.
- [11] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Dev Biol* 1994;91:11298-302.
- [12] Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells* 2007;25:2330-8.
- [13] Pryzant RM, Meistrich ML, Wislon G, Brown B, McLaughlin P. Long-term reduction in sperm count after chemotherapy with and without radiation therapy for non-hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1993;11:239-47.
- [14] Fukutani K, Ishida H, Shinohara M, Minowada S, Nijima T, Hijikata K, et al. Suppression of spermatogenesis in patients with behçet's disease treated with cyclophosphamide and colchicine. *Fertil Steril* 1981;36:76-80.
- [15] Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* 1997;56:1490-7.
- [16] Meistrich ML, Parchri N, Wilson G, Kurdoglu B, Kangasniemi M. Hormonal protection from cyclophosphamide-induced inactivation of rat stem spermatogonia. *J Androl* 1995;16:334-41.
- [17] Nishimune Y, Aizawa S. Temperature sensitivity of DNA synthesis in mouse testicular germ cells in vitro. *Exp Cell Res* 1978;113:403-8.
- [18] Chiarini-Garcia H, Russell LD. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 2001;65:1170-8.
- [19] Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. High resolution light microscopic characterization of spermatogonia. In: Hou SX, Singh SR, editors. *Germline Stem Cells*, New York: Humana Press Inc; 2008, p. 95-107p.

- [20] Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 1946; 94:239-47.
- [21] Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. Irradiated mouse testes efficiently support spermatogenesis derived from donor germ cells of mice and rats. *J Androl* 2006;27:365-75.
- [22] Karashima T, Zalutnai A, Schally AV. Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against chemotherapy-induced testicular damage in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:2329-33.
- [23] Velez de la Calle JF, de Queiroz F, Gamier DH, Kercret H, Folliot R, Jegou, B. Reproductive effects of the anticancer drug cyclophosphamide in male rats at different ages. *Arch Androl* 1989;22:251-63.
- [24] Russell LD, Russell JA. Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am J Anat*. 1991;192:142-68.
- [25] Meistrich ML, Finch M, da Cunha MF, Hacker U, Au WW. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res* 1982;42:122-31.
- [26] Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11303-7.
- [27] Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987;176:159-268.
- [28] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod* 2005;20: 2376-82.
- [29] Zhang Z, Shao S, Shetty G, Meistrich M. Donor Sertoli cells transplanted into irradiated rat testes stimulate partial recovery of endogenous spermatogenesis. *Reprod* 2009;137:497-508.
- [30] Meistrich ML, Bruce WR, Clermont Y. Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation. *Exp Cell Res* 1973;79:213-27.
- [31] Barroca V, Lassalle B, Coureuil M, Louis JP, Le Page F, Testart J, et al. Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo. *Nat Cell Biol* 2008;11:190-201.
- [32] Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE, Yoshida S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenesis stem cell compartment. *Science* 2010;328:62-7.
- [33] Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell* 2007;12:195-206.
- [34] de Rooij DG. Regulation of the proliferation of spermatogonial stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:181-94.
- [35] de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001;121:347-54.



[36] Wang G, Shao SH, Weng CC, Wei C, Meistrich ML. Hormonal suppression restores fertility in irradiated mice from both endogenous and donor-derived stem spermatogonia. *Toxicol Sci* 2010;117:225-37.

[37] Hsu AC, Folami AO, Bain J, Rance CP. Gonadal function in males treated with cyclophosphamide for nephrotic syndrome. *Fertil Steril* 1979;31:173-8.

## Tables

**Table 1** – Assessment intervals for sperm counts chosen based on predicted recovery of sperm production from different cell types potentially affected by cyclophosphamide.

Days after last injection	Latest stage of cell capable of producing testicular spermatozoa at indicated time <sup>a</sup>
34	A <sub>2</sub> spermatogonia, stage IX
37	A <sub>aligned</sub> spermatogonia, stage VI
40	A <sub>paired</sub> spermatogonia, stage I
45	A <sub>single</sub> spermatogonia, stage VI
56	A <sub>single</sub> spermatogonia, earlier cycle

<sup>a</sup> Based on different stage of the seminiferous epithelial cycle [4].

**Table 2** - Testis weight and sperm head count per testis 28 days the start of treatment. Treatment was given as a single dose (Expt. 1) or with 6 doses given at 5-day intervals (Expt. 2) or 7 doses at 4-day intervals (Expt. 3) (N=3). Different letters indicate statistically significant differences among all groups (p<0.05).

	Testis Weight	Sperm Head Count
Control	83.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	16.7 ± 1.9 x10 <sup>6 a</sup>
<b>Expt. 1</b>		
150 p.o.	67.8 ± 3.3 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.2 x10 <sup>6 b,c</sup>
150 i.p.	59.9 ± 3.6 <sup>c</sup>	1.2 ± 0.05 x10 <sup>6 c</sup>
200 p.o.	63.0 ± 0.8 <sup>b,c</sup>	1.0 ± 0.02 x10 <sup>6 c</sup>
200 i.p.	57.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.1 ± 0.2 x10 <sup>6 c</sup>
<b>Expt. 2</b>		
150 p.o. / 5 days	31.3 ± 2.8 <sup>d</sup>	2.2 ± 0.3 x10 <sup>6 b</sup>
150 i.p. / 5 days	30.3 ± 3.3 <sup>d</sup>	2.9 ± 0.1 x10 <sup>6 b</sup>
<b>Expt. 3</b>		
150 p.o. / 4 days	30.5 ± 1.1 <sup>d</sup>	2.9 ± 0.3 x10 <sup>6 b</sup>

**Table 3** - Testis weight of donor animals, and number of cells obtained in tubule cell suspensions per testis. (N=5 for young, adult and CY; N=10 for cryptorchid, after exclusion of testes >30 mg).

Donor	Testis Weight (mg)	Cells / Testis (x10 <sup>6</sup> )
Young	11.5	3.4
Adult	104.0	21.2
Adult/Cryptorchid	27.1	1.2
Adult/Cyclophosphamide	29.9	1.3

**Table 4** - Numbers of cells injected and recovery of spermatogenesis in the recipient testes. The percentages of tubules are given for recovery of endogenous spermatogenesis (GFP-negative), donor colonies (GFP+), and donor colonies normalized to the average number of cells injected are shown. Values expressed as Mean ± SEM (N=10 testes for young, CY and cryptorchid; N=7 testes for adult). Different letters indicate statistically significant differences among all groups (p<0.05).

Source of donor cells	Numbers of viable cells injected	Tubules showing endogenous recovery (%)	Tubules showing donor (GFP+) recovery (%)	Donor recovery normalized to average number of cells injected
Young	0.19 ± 0.01 x10 <sup>6</sup>	3.4 ± 0.8	13.8 ± 3.5 <sup>a</sup>	15.0 ± 3.6 <sup>a</sup>
Adult	0.16 ± 0.02 x10 <sup>6</sup>	4.6 ± 0.8	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>b</sup>
Cryptorchid	0.15 ± 0.01 x10 <sup>6</sup>	2.9 ± 0.6	6.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	7.5 ± 2.0 <sup>a</sup>
Cyclophosphamide	0.19 ± 0.01 x10 <sup>6</sup>	4.7 ± 1.1	2.4 ± 0.8 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.8 <sup>b</sup>




## Legends

**Figure 1** – Schematic time lines of treatments used in three experiments, with end points indicated. Days of administration of cyclophosphamide (CY) are indicated by downward arrows. Days at which subgroups of mice were euthanized are indicated by upward arrows and the endpoints assessed after tissue harvest are indicated above the line. **Legend:** SHC, sperm head count.

**Figure 2** – Percentage of tubules with TUNEL-positive cells for each stage of seminiferous epithelium, at 1, 2 and 3 days after injection in mice that received one dose of cyclophosphamide (150 mg/Kg p.o.). Values expressed as Mean ± SEM (N=3 for each endpoint, and control group). Asterisks indicate statistically significant differences from control (p<0.05). The differentiating spermatogonial cell types or preleptotene spermatocytes (PI) present at each stage are indicated below the stage.

**Figure 3** – Seminiferous tubule cross-sections of testes of mice that received saline injection (**A**), and those that received one injection of cyclophosphamide, p.o. at 150 mg/Kg, 11 days previously (**B**), or 28 days previously (**C, D**). Arrowheads: areas where spermatocytes (**B**) or elongated spermatids (**C, D**) are missing; Arrows: areas where there are remaining elongating and condensed spermatids; Stages of seminiferous epithelium are indicated in the lumen of the tubules. (A,C,D) paraffin embedded; (B) methacrylate embedded. Bars indicate 70 micrometers.

**Figure 4** – Germ cells organized in the twelve stages of seminiferous epithelium cycle. Stages/germ cells that are affected by the cyclophosphamide are shaded.

(A) Cells observed in testes 11 days after p.o. CY injection at 150 mg/Kg. (B) Calculated cells affected at time of injection. Arrows indicate mitotic divisions and spermatogonial differentiation. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In and B, differentiating spermatogonia; preL, preleptotene; L, leptotene; Z, zygotene; P, pachytene; D, diplotene; M, meiotic divisions.  Appreciably reduced;  Nearly completely absent;  Absent.

**Figure 5** – Seminiferous tubule cross-sections of mice that received saline injections (**A,B**) showing Sertoli cells (S) and type B differentiating spermatogonia. (**C,D**), Seminiferous tubules of mice that received multiples doses of cyclophosphamide (Expt. 2 -150 mg/Kg p.o., 6 doses, at 5-day intervals), 28 days after first injection showing severe damage to the germinal epithelium at the end of the treatment. The tubules contain predominantly Sertoli cells (S). Some remaining spermatocytes (arrowheads) and spermatids are observed as well as some type B (“B”) and type A spermatogonia. (**E,F**) Undifferentiated type A spermatogonia in the control and the treated animals, respectively. (**G**) Seminiferous tubules of the treated animals, 81 days after first injection, showing recovery in most of the tubules (\*\*), but some tubules are still damaged (\*). Tissues in A, C, and G were Bouin’s fixed, paraffin embedded and stained with PAS-hematoxylin. Those in B, D, E, and F were prepared for HRLM by glutaraldehyde fixation, araldite embedding, and toluidine blue staining. Black bars represent 70 micrometers, and white bars represent 20 micrometers (**B,D**) or 10 micrometers (**E,F**).

**Figure 6** – Relative numbers of different types of germ cells per 100 Sertoli cells in tubules of animals treated with 150 mg/Kg dose of cyclophosphamide p.o. and i.p., every 5 days, and 150 mg/Kg p.o., every 4 days. **Legend:** In-PI, differentiating In and type B spermatogonia plus preleptotene spermatocytes. A<sub>und</sub>, undifferentiated spermatogonia type A; A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>, differentiating type A spermatogonia. Values expressed as Mean ± SEM (N=3). Different letters indicate statistically significant differences among all groups (p<0.05).

**Figure 7 – A)** Testis weight and **B)** sperm head count per testis for mice treated with multiple doses of cyclophosphamide (150 mg/Kg p.o. or i.p.), starting 28 days after initiation of treatment, showing the recovery of spermatogenesis. Note only 28-day and 80-day points were obtained for Expt. 3 (p.o doses at 4 day intervals) A sham-treated control group is shown for comparison. Times are given on the X-axis from the time of the first injection. Values expressed as Mean  $\pm$  SEM (N=3). Different letters indicate statistically significant differences among all groups ( $p < 0.05$ ).

**Figure 8 –** Relative numbers of different types of germ cells per 100 Sertoli cells in tubules of young mice, and adults with no treatment, cryptorchidization, or treatment with cyclophosphamide (CY), and percentage of germ cells that are A undifferentiated spermatogonia. **Legend:** In-PI, differentiating In and type B spermatogonia plus preleptotene spermatocytes.  $A_{und}$ , undifferentiated type A spermatogonia;  $A_1$ - $A_4$ , differentiating type A spermatogonia. Values expressed as Mean  $\pm$  SEM (N=3). Different letters indicate statistically significant differences among all groups ( $p < 0.05$ ).

**Figure 9 –** Histological and immunohistochemical analysis of seminiferous tubules of the recipient animals transplanted with cells from prepubertal donors (**A,B**), adult donors (**C,D**), adult cryptorchid donors (**E,F**) and adults treated with cyclophosphamide (CY) (**G,H**), at 8 weeks after transplantation. Slides were immunostained with antibodies to GFP and visualized with the diaminobenzidine chromophore (brown). An endogenous colony is indicated by "\*" and donor colonies are stained brown. At higher magnification (**B,D,F,G**) the production of elongated spermatids (arrows) at this time point is observed in donor colonies. White bars indicate 70 micrometers.

**NOTE: This figure is intended for color reproduction on the web and in print.**

**Figure 1**

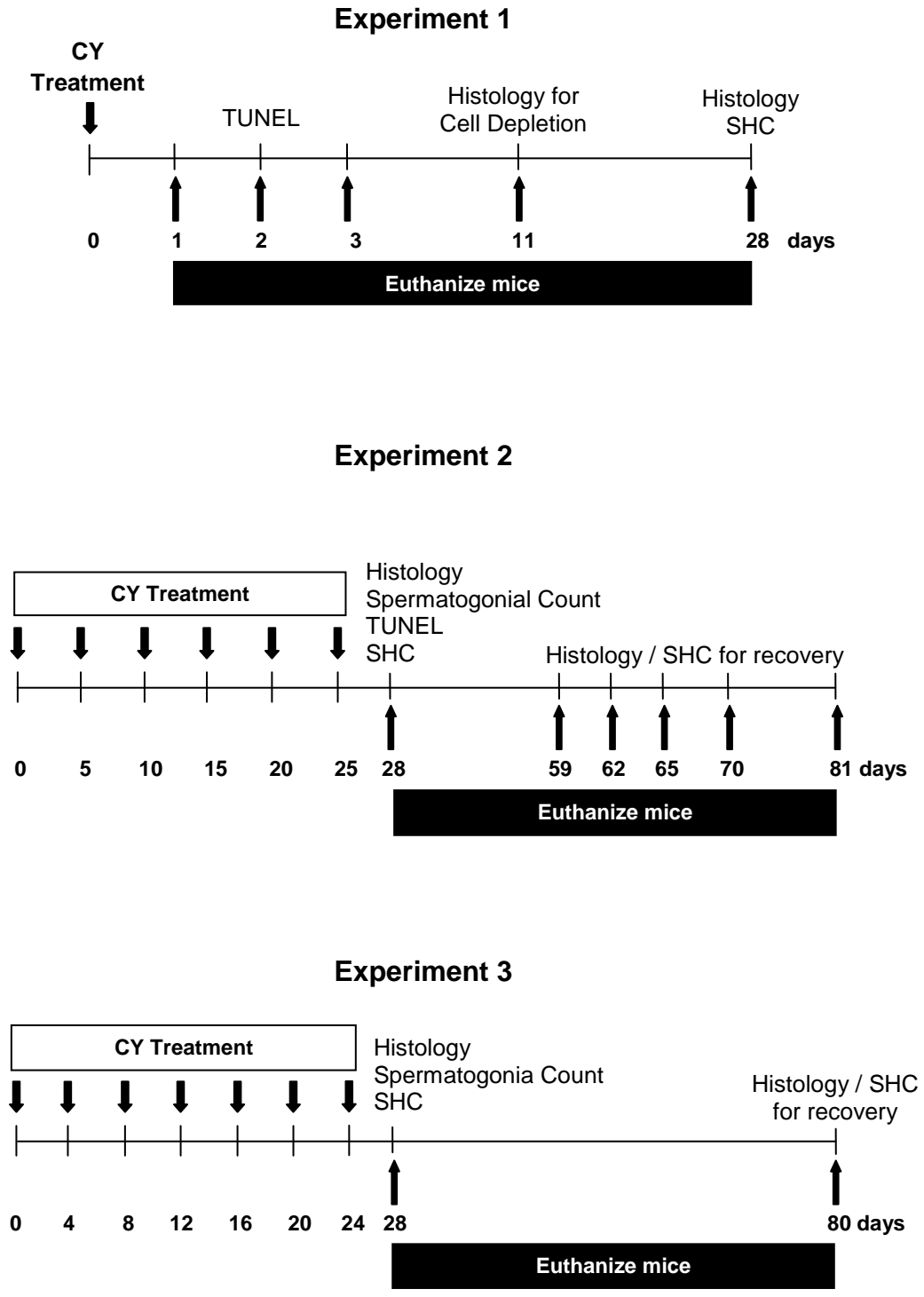


Figure 2

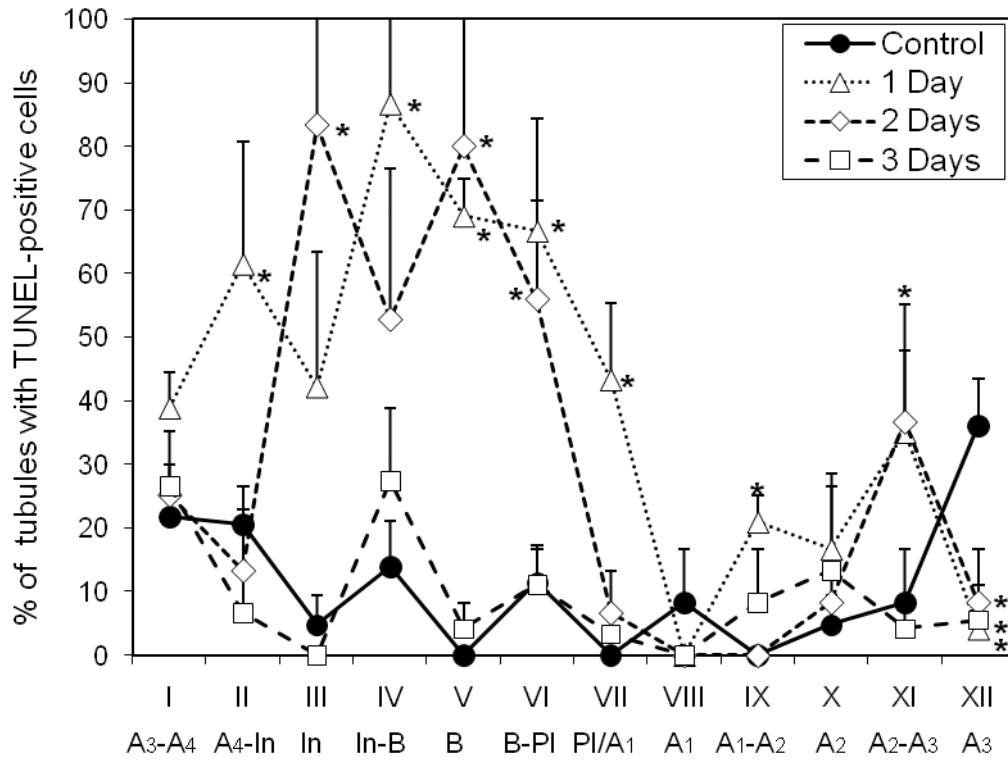


Figure 3

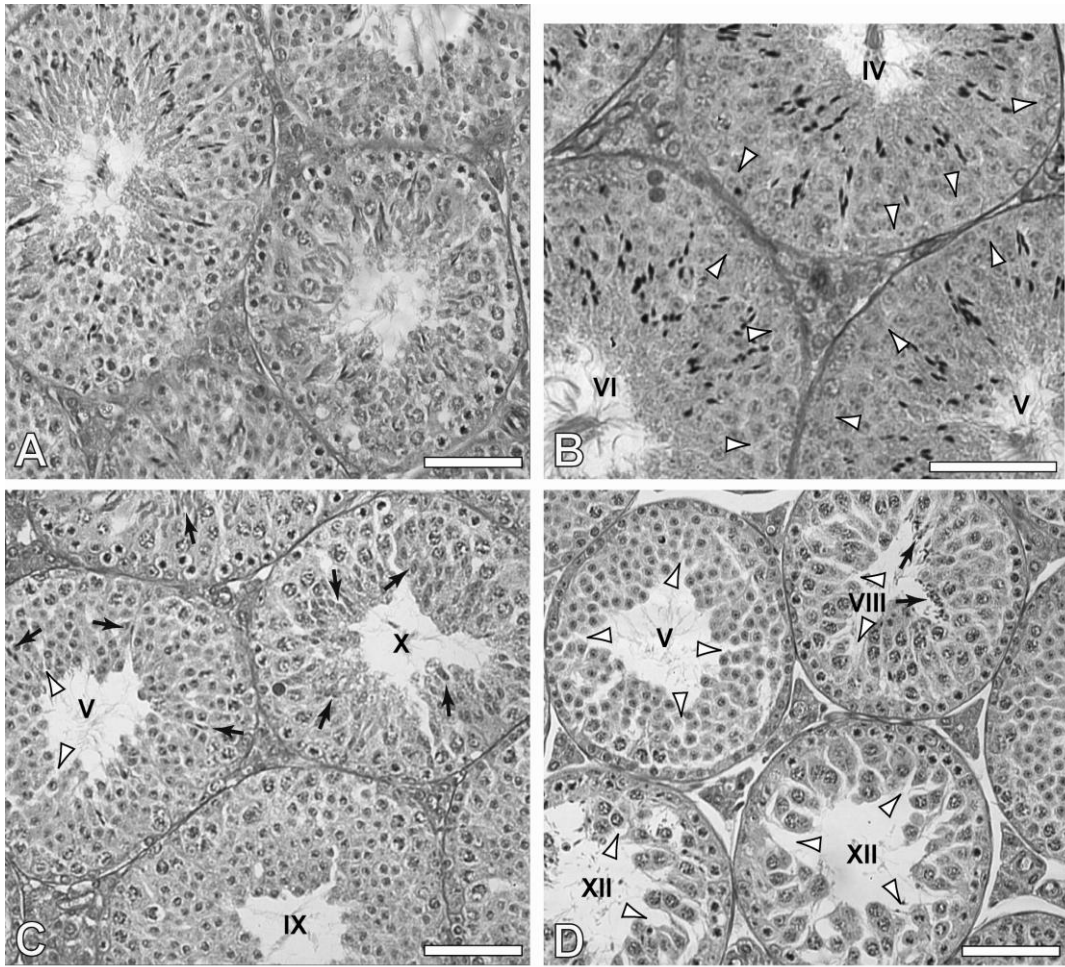
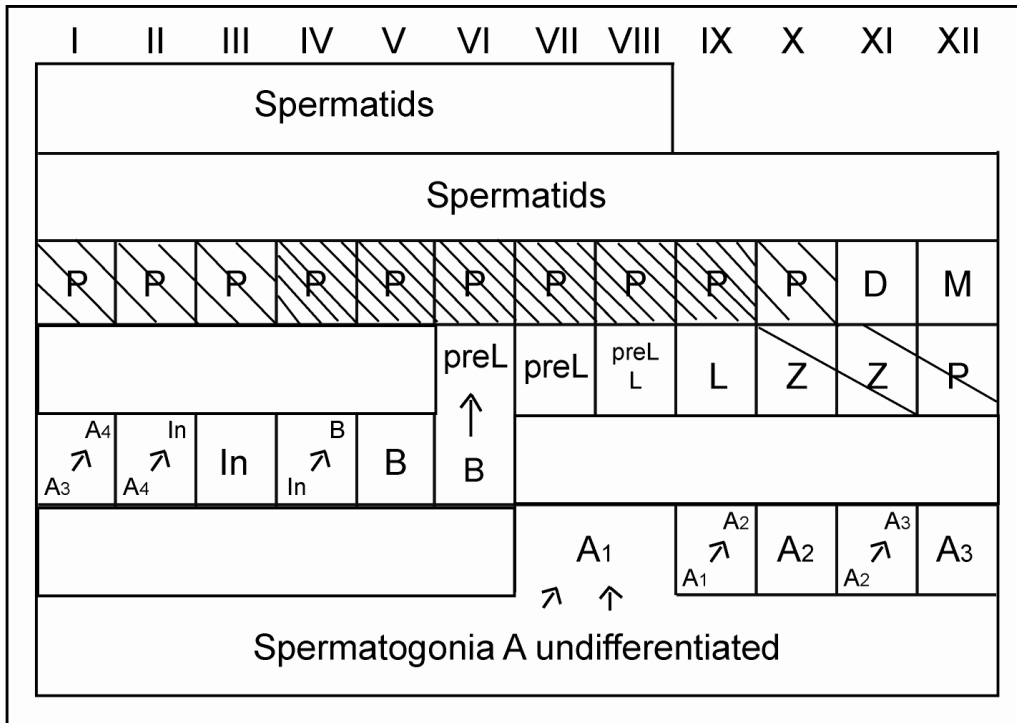


Figure 4

**(A) Germ cells observed 11 days after a single injection**



**(B) Spermatogonia eliminated at the time of injection**

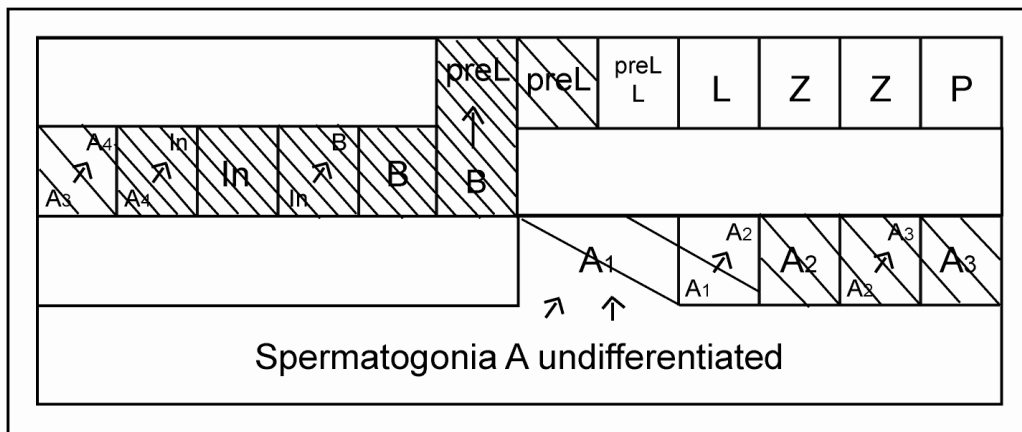




Figure 5

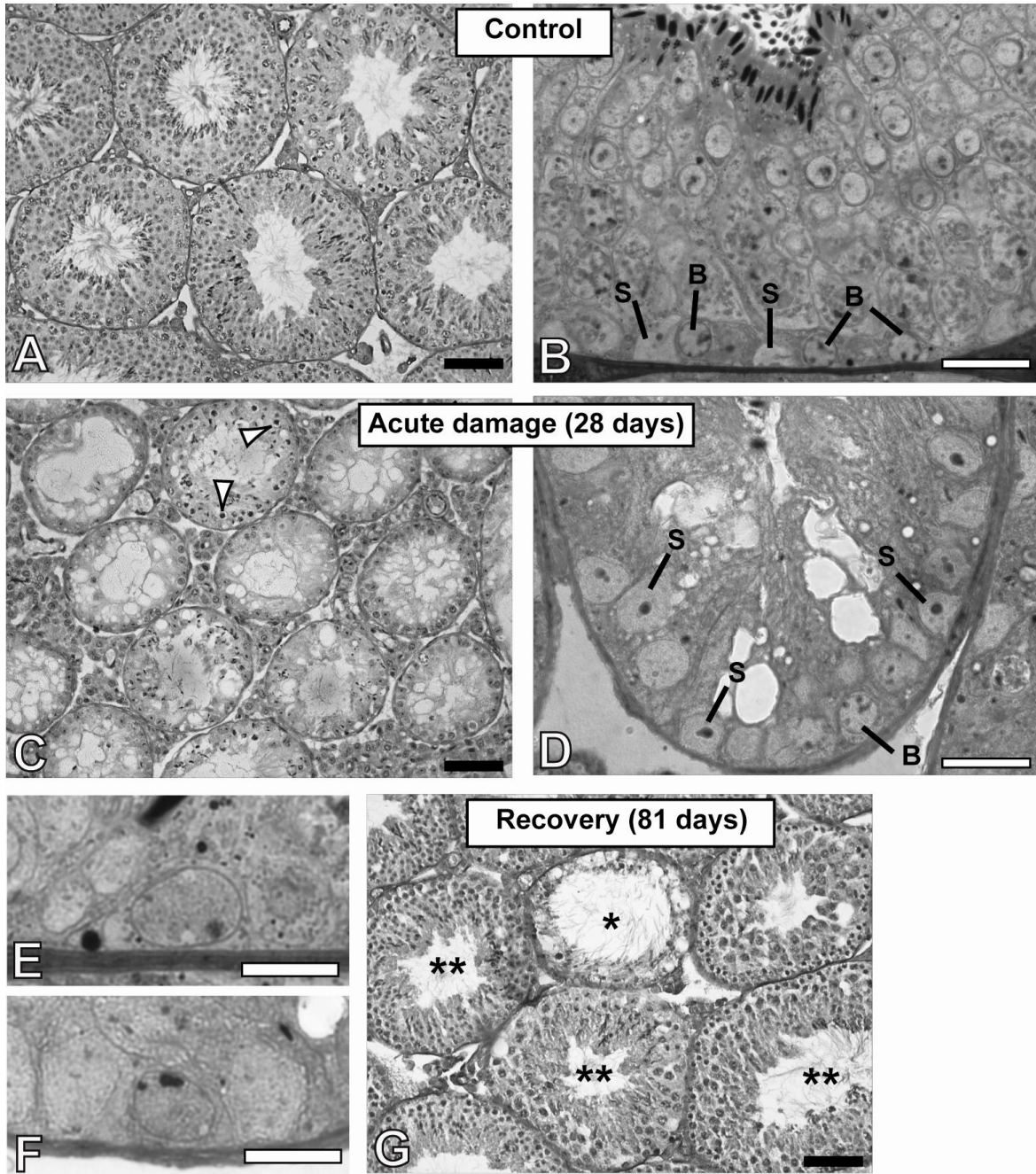


Figure 6

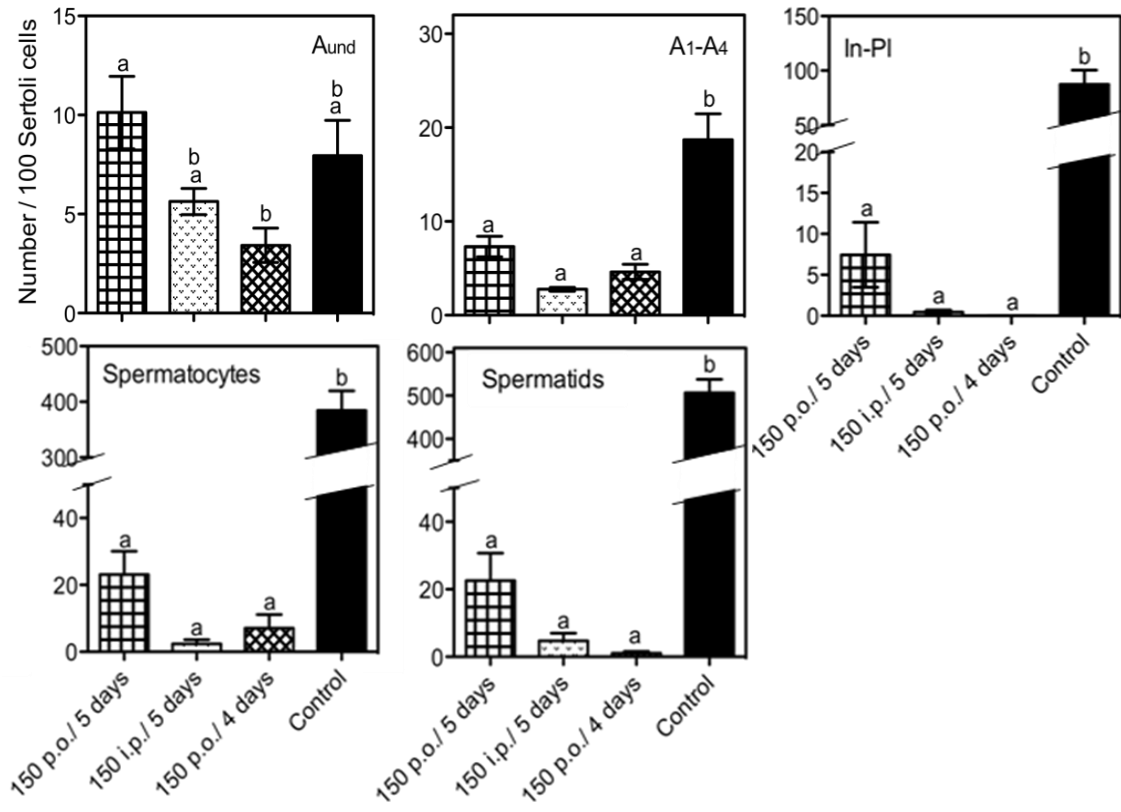
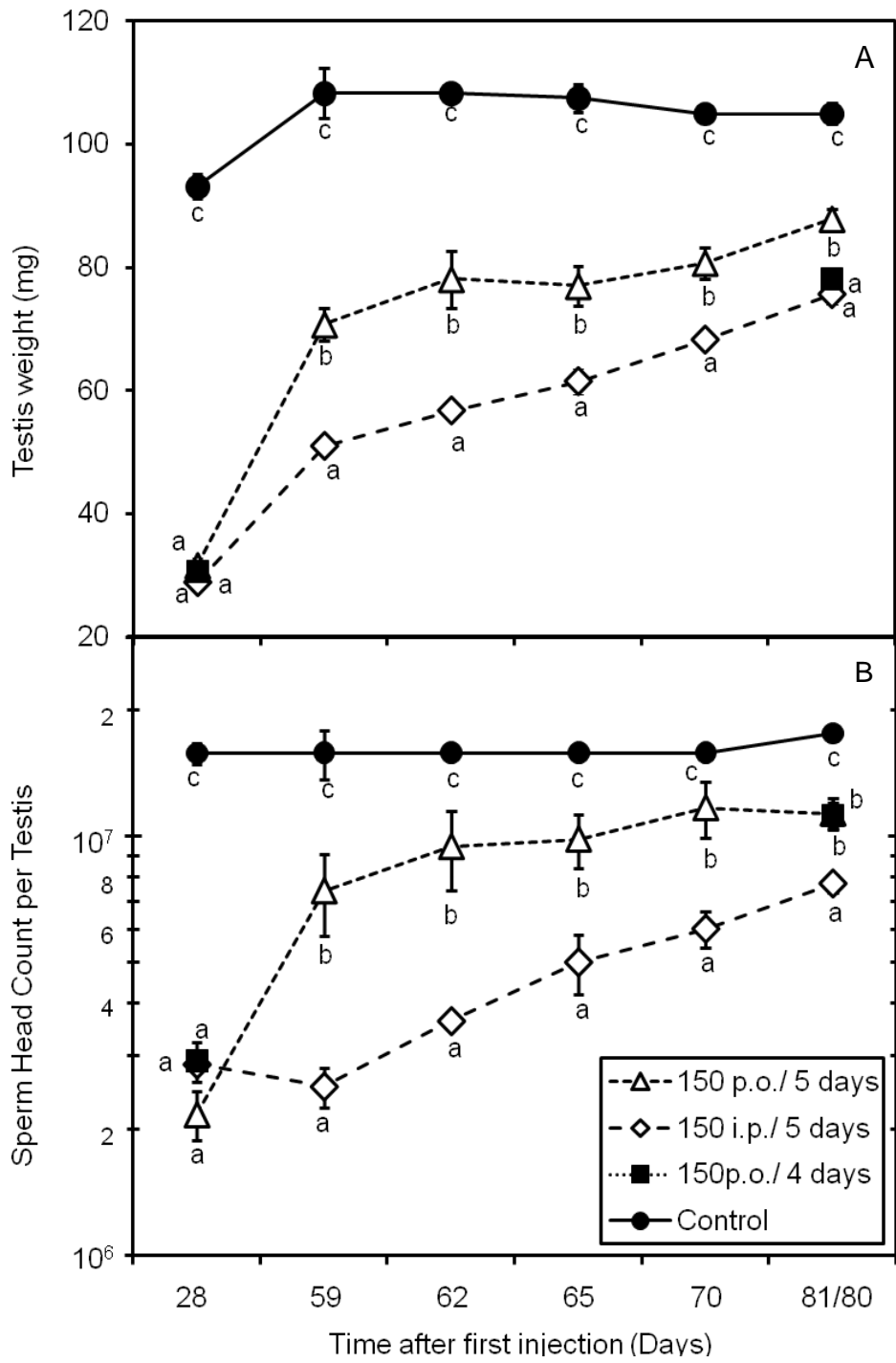


Figure 7



**Figure 8**

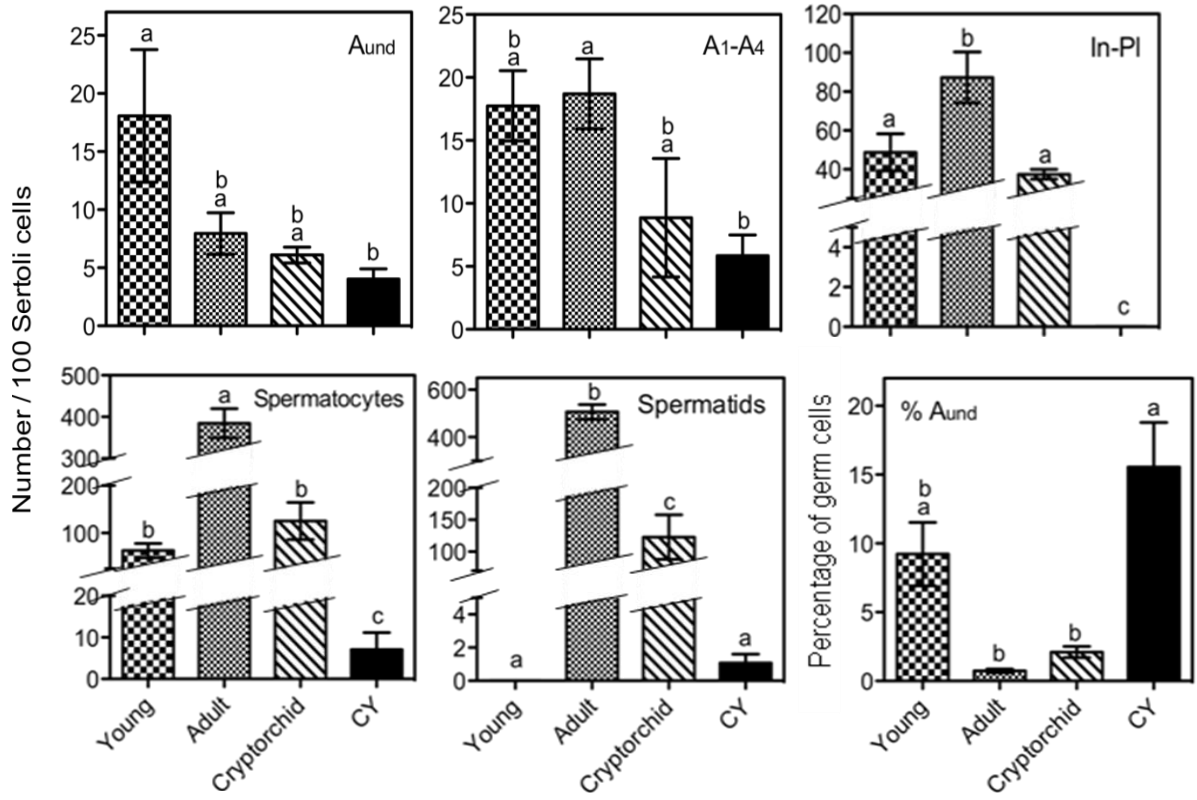
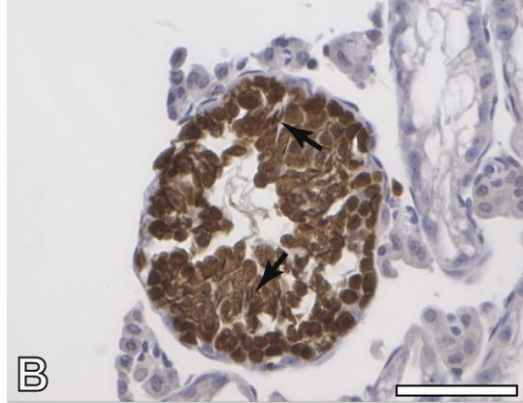
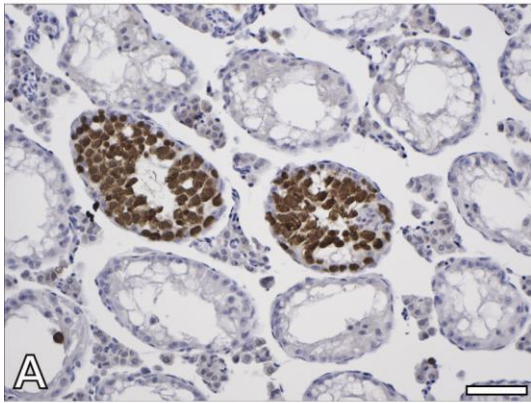
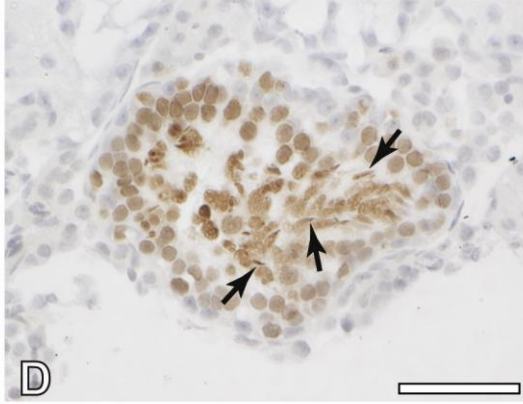
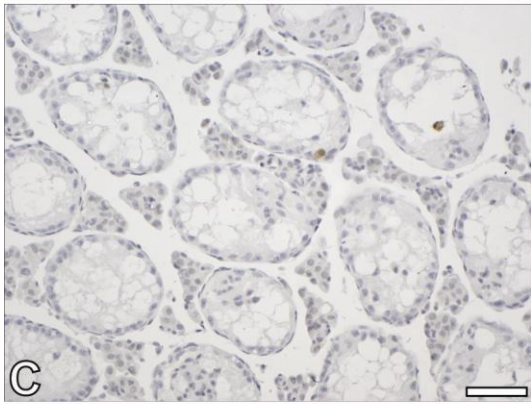


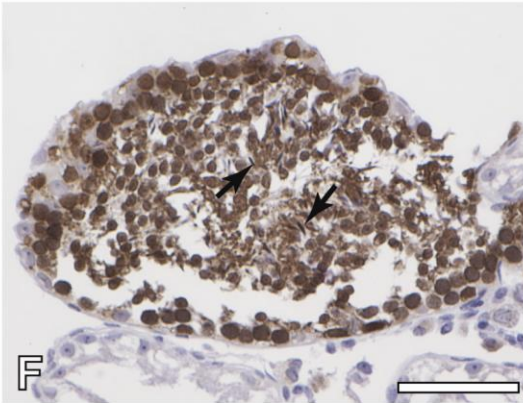
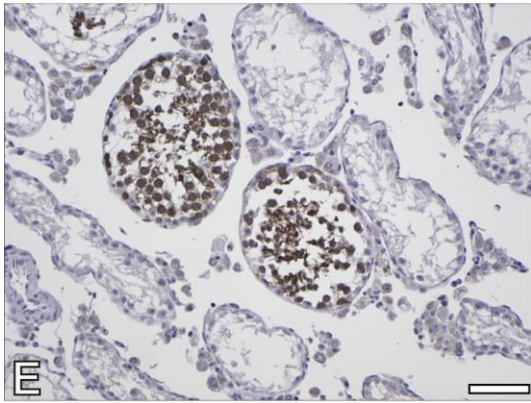
Figure 9



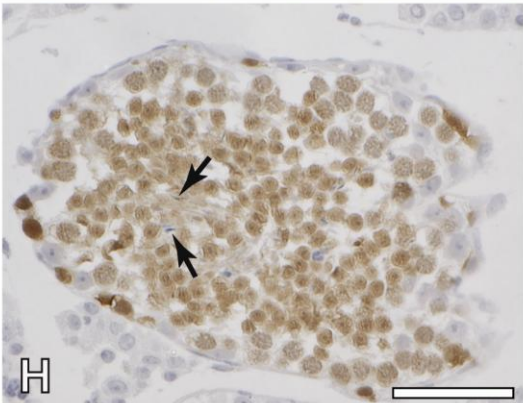
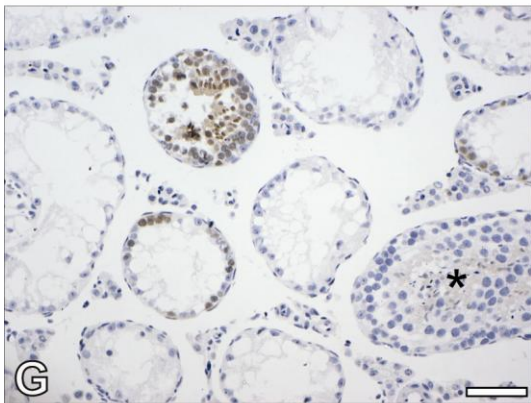
Young



Adult



Adult / Cryptorchid



Adult / CY