

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

**BIOLOGIA E NICHOS DE ESPERMATOGÔNIAS TRONCO EM CATETOS (*Tayassu tajacu*) ADULTOS**

**MESTRANDO: PAULO HENRIQUE DE ALMEIDA CAMPOS-JUNIOR**

**ORIENTADOR: LUIZ RENATO DE FRANÇA**

**Belo Horizonte**

**2011**

**PAULO HENRIQUE DE ALMEIDA CAMPOS-JUNIOR**

**BIOLOGIA E NICHOS DE ESPERMATOGÔNIAS TRONCO EM CATETOS (*Tayassu tajacu*) ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Luiz Renato de França

**Belo Horizonte**

**2011**



Dedico este trabalho a minha mãe Marise Almeida Campos.

## AGRADEÇO

Às agências financiadoras (CNPq e FAPEMIG) pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Professor Luiz Renato de França, pela brilhante orientação neste trabalho.

Aos co-autores deste trabalho: Guilherme Costa, Samyra Lacerda e José Rezende-Neto.

A todos os demais companheiros do Laboratório de Biologia Celular.

À coordenação e professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular.

Ao Laboratório de Biofotônica do Departamento de Física, pelo auxílio nas análises de microscopia de multifótons.

A Fazenda Engenho D'Água e Embrapa Amazônia Oriental pelo fornecimento dos animais para nossos estudos.

À professora Marie-Claude Hofmann, da Universidade de Illinois (EUA) pelo auxílio técnico-científico.

À professora Tânia Mara Segatelli, pelos auxílios e amizade.

Aos amigos de Juiz de Fora que compreenderam minha ausência e deram força à distância.

E principalmente à minha família, pois sem estes não estaria concluindo esta etapa.

**Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Renato de França, com o auxílio das seguintes instituições:**

- ✓ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- ✓ Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)**

*“Para ser grande, ser inteiro; nada teu exagera ou  
exclui; seja todo em cada coisa; põe quanto és no  
mínimo que fazes; assim em cada lago, a lua toda  
brilha, porque alta vive.”*

(Fernando Pessoa)

## RESUMO

No epitélio seminífero, as células tronco espermatogoniais (SSCs) apresentam-se localizadas em micro-ambientes específicos denominados “nichos espermatogoniais”, que são regulados pela membrana basal, células somáticas testiculares e fatores provenientes destas e dos vasos sanguíneos. No entanto, o exato papel das células de Leydig (CL) como componente do nicho espermatogonial permanece ainda desconhecido. Estudos recentemente desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que catetos (*Tayassu tajacu*) apresentam citoarquitetura peculiar das CL, na qual estas células envolvem lóbulos de túbulos seminíferos formando estruturas semelhantes a cordões celulares. Esta particularidade torna os catetos um modelo experimental ímpar para se investigar a biologia e nicho espermatogonial em mamíferos. Este aspecto peculiar permite também subdividir as secções transversais de túbulos seminíferos em três diferentes regiões: [túbulo-túbulo (T-T); túbulo-interstício (T-I); e túbulo-CL (T-CL)]. Os objetivos do presente estudo foram os de se caracterizar os diferentes tipos espermatogoniais de catetos e determinar a localização e/ou distribuição das SSCs nos túbulos seminíferos desta espécie, utilizando diferentes abordagens metodológicas. Comparado com as espermatogônias em diferenciação ( $A_{dif}$ ), as espermatogônias indiferenciadas ( $A_{und}$ ) apresentaram volume nuclear maior ( $p < 0.05$ ), o que permitiu uma acurada avaliação de sua distribuição. Análises de imuno-marcações demonstraram que todas  $A_{und}$  expressam GFR $\alpha$ 1 que é o receptor de membrana para o GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) produzido pelas células de Sertoli. No entanto, principalmente as espermatogônias A isoladas ( $A_s$ ) e A pareadas ( $A_{pr}$ ) apresentaram-se preferencialmente localizadas na região T-I ( $p < 0.05$ ), enquanto clones espermatogoniais contendo 8 ou mais células ( $A_{al}$ ) apresentaram-se principalmente na região T-CL ( $p < 0.05$ ). A expressão do CSF-1 (Colony stimulating factor -1) foi observada nas CL e células peritubulares mióides (CPM) enquanto seu receptor (CSF-1r) foi observado nas CL e em todas as espermatogônias  $A_{und}$  GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>. Desta forma, estes resultados sugerem fortemente que, diferentemente das CPM, as CL atuam negativamente no nicho e fisiologia espermatogonial, e que estas células esteroideogênicas estão possivelmente envolvidas na diferenciação das espermatogônias  $A_{und}$  para  $A_1$ .

**Palavras chave:** testículo, células tronco espermatogoniais, nicho, célula de Sertoli, células de Leydig, células peritubulares mióides, GDNF, GFRA1, CSF-1r, cateto, suiforme.



## ABSTRACT

In the seminiferous epithelium, spermatogonial stem cells (SSCs) are located in a particular environment called “niche” that is controlled by the basement membrane, key testis somatic cells, and by factors emanating from the vascular network. However, the role of Leydig cells (LC) as a niche component is not yet clearly elucidated. Recent studies showed that peccaries (*Tayassu tajacu*) present a peculiar LC cytoarchitecture, where these cells are located around the seminiferous tubules lobes, making the peccary an unique model for investigating SSCs. This peculiarity allowed us to subdivide the seminiferous tubules cross-sections in three different regions [tubule-tubule (T-T); tubule-interstitium (T-I); and tubule-LC contact (T-LC)]. Our aims were to characterize the different spermatogonial cell types in this species and to determine the location and/or distribution of the SSCs along the seminiferous tubules. Compared to differentiating spermatogonia ( $A_{diff}$ ), undifferentiated spermatogonia ( $A_{und}$ ) presented a noticeably higher nuclear volume ( $p < 0.05$ ), allowing an accurate evaluation of their distribution. Immunostaining analysis demonstrated that all  $A_{und}$  ( $A_s$ ,  $A_{pr}$  and  $A_{al}$ ) were GFRA1<sup>+</sup>. However, only A-single ( $A_s$ ) and A-paired ( $A_{pr}$ ) spermatogonia were located in the T-I ( $p < 0.05$ ), whereas clones containing eight or more undifferentiated cells ( $A_{al}$ ) were situated close to the T-LC ( $p < 0.05$ ). The expression of CSF-1 was observed in LC and peritubular myoid cells (PMC) while its receptor was present in LC and in GFRA1<sup>+</sup>  $A_{und}$ . Taken together, our findings strongly suggest that, different from PMC, LC play a negative role in the SSC niche and physiology and that these steroidogenic cells are probably involved in the differentiation of  $A_{und}$  toward type  $A_1$  spermatogonia.

**Keywords:** Testis, spermatogonial stem cell (SSC), niche, Sertoli cells, Leydig cells, peritubular myoid cells, GDNF, GFRA1, CSF-1r, collared peccary, suiform.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	50
Figura 2.....	51
Figura 3.....	52
Figura 4.....	53
Figura 5.....	54
Figura 6.....	55
Figura 7.....	56
Figura 8.....	57
Figura 9.....	58
Figura 10.....	59

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
1.1 Catetos.....	11
1.2 Aspectos gerais do testículo em mamíferos .....	11
1.3 Processo espermatogênico.....	16
1.4 Biologia espermatogonial.....	17
1.5 Nicho de Células Tronco espermatogoniais.....	19
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Animais experimentais.....	26
3.2 Coleta e processamento dos testículos.....	26
3.3 Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero através do sistema acrossômico.....	27
3.4 Caracterização dos tipos espermatogoniais.....	27
3.5 Análise da distribuição das espermatogonias .....	29
3.6 Imunohistoquímica.....	29
3.7 Série Z.....	30
3.8 Western Blotting.....	31
3.9 Análise estatísticas.....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	33
4.1 Citoarquitetura testicular baseada no padrão de distribuição de células de Leydig no parênquima testicular.....	34
4.2 Estádios do ciclo do epitélio seminífero caracterizados através do sistema acrossômico.....	34
4.3 Morfologia cinética e volume espermatogonial.....	35
4.4 Distribuição espermatogonial.....	37
4.5 Fenótipo espermatogonial e imunolocalização de CSF-1.....	37
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>7. FIGURAS</b> .....	49
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60
<b>9. ANEXOS</b> .....	73
9.1 Protocolo Cetea	
9.2 Artigo publicado na revista <i>Biology of Reproduction</i>	
9.3 Artigo publicado na revista <i>Suiform soundings</i>	

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução e Revisão de Literatura

### 1.1. Catetos

O cateto (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758; Figura 1A) é um mamífero ungulado da ordem Artiodáctila, subordem Nonruminantia, superfamília Suidea e família Tayassuidae (Lobo, 1962). Esta espécie ocupa diferentes habitats, incluindo-se florestas tropicais, savanas e desertos, e encontra-se distribuída desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e em praticamente todo o território brasileiro. Os catetos são considerados espécies onívoras e de hábitos gregário e sedentário por não se distanciarem do seu local de nascimento (Garcia *et al.*, 2009). Estes ungulados aparentados aos suínos apresentam características bem particulares, tais como uma faixa de pelos esbranquiçados na região cervical, que confere estrutura semelhante a um colar (daí o nome em inglês de “collared peccary”), e a existência de uma glândula dorsal localizada cerca de 20 centímetros da cauda. Glândula esta testosterona dependente (Silva *et al.*, 2005) e que possui secreção oleosa de odor forte que é utilizada principalmente para a comunicação social entre os indivíduos do mesmo grupo. Além disso, esta espécie apresenta grande potencial econômico por apresentar características com alta apreciação no mercado consumidor, tais como alta qualidade de seu couro e de sua carne (Silva *et al.*, 2005).

### 1.2. Aspectos gerais do testículo em mamíferos

Classicamente, a gônada masculina possui as funções de produção de gametas e biosíntese de hormônios masculinos denominados de andrógenos. Na maioria das espécies de mamíferos, os testículos estão localizados no escroto (Figura 1A) que propicia um microambiente capaz de regular a temperatura testicular através de vários mecanismos envolvendo, por exemplo, os vasos, músculo liso e esquelético, glândulas sudoríparas e os pêlos. Por outro lado, em diversas espécies este órgão apresenta-se localizado no canal inguinal e na cavidade abdominal próximo à bexiga ou até mesmo aos rins (Setchell & Breed, 2006). O testículo é revestido externamente por tecido conjuntivo espesso denominado de túnica albugínea, que emite trabéculas ou septos

para o interior deste órgão, delimitando os lóbulos testiculares. Próximo à extremidade capitata do testículo localiza-se o funículo espermático que contém artérias, vasos linfáticos, veias, nervos, músculo cremáster e o ducto deferente, que se origina na cauda do epidídimo localizada próximo à extremidade caudata do testículo (Amann, 1981; Russell *et al.*, 1990).

Em mamíferos e na grande maioria das espécies de vertebrados, o testículo é dividido morfofuncionalmente em compartimentos tubular e intertubular (Russell *et al.*, 1990). O compartimento tubular compreende os túbulos seminíferos, que representam usualmente de 70% a 90% do parênquima testicular e se estendem numa rede convoluta que se conecta com a rete testis localizada na região do mediastino testicular (Figura 1B; França & Russell, 1998). Os túbulos seminíferos são formados de fora para dentro pela túnica própria, epitélio seminífero e lume. A túnica própria é formada pelas células peritubulares mióides, que possuem características de células contráteis, e matriz extracelular. Assim, esta túnica delimita o epitélio seminífero que é constituído pelas células germinativas originadas do epiblasto e células somáticas ou de Sertoli que provavelmente são provenientes do epitélio celomático (DeFalco & Capel, 2009). Já a região central dos túbulos compreende o lume tubular resultante da secreção de fluido através das células de Sertoli, sob a influência principalmente dos andrógenos, particularmente a testosterona, fluido este responsável por carrear os espermatozoides recém-formados/espermiados e ainda imóveis através de parte dos ductos excurrentes (rete testis, ductulos eferentes, e ducto epididimário).

As células de Sertoli desempenham papel crucial na espermatogênese e na estrutura dos túbulos seminíferos e, juntamente com as células peritubulares mióides, sintetizam a membrana basal que é fundamental para a integridade e a função tubular (Dym, 1994). Além disso, através de suas junções de oclusão, as células de Sertoli dividem o epitélio seminífero em compartimentos basal e adluminal (Russell & Griswold, 1993). No compartimento basal estão localizadas as espermatogônias e espermatócitos primários iniciais (pré-leptótenos/leptótenos), enquanto no adluminal encontram-se os espermatócitos primários a partir de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Funcionalmente, as junções de oclusão compõem a barreira hemato-testicular ou de células de Sertoli que propicia um microambiente

específico e imunoprivilegiado essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell *et al.*, 1990; Russell & Griswold, 1993; França *et al.*, 2011).

No contexto acima mencionado merece ser ressaltado que durante o processo espermatogênico as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto funcionalmente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre estes dois tipos celulares, incluindo-se os desmossomos, complexos túbulos-bulbares, junções do tipo “gap” e junções à base de actina, conhecidas como especializações ectoplasmáticas (Russell & Griswold, 1993; Kopera *et al.*, 2010). Estas últimas parecem impedir a descamação (sloughing) das células germinativas do epitélio seminífero, evitando assim a infertilidade. Particularmente, as junções semelhantes a desmossomos e as especializações ectoplasmáticas da porção basal do epitélio seminífero coexistem com as células de Sertoli, ao nível da barreira hemato-testicular (conhecida também como barreira de células de Sertoli), onde as mesmas auxiliam as junções de oclusão na manutenção da barreira imunológica Kopera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2011). De maneira geral, fica bastante evidente a necessidade da interação parácrina das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, Leydig e peritubulares mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Russell *et al.*, 1994; França & Russell, 1998; Welsh *et al.*, 2009). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e peritubulares mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

Nos testículos de animais sexualmente maduros as células de Sertoli estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli, durante o ciclo do epitélio seminífero, demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o que reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (Russell *et al.*, 1993). Além da formação da barreira de célula de Sertoli já comentada anteriormente, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, podem ser citados o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas, mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos

residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose. Conforme já foi mencionado, as células de Sertoli secretam ainda fluido em direção ao lume tubular, o qual possui substâncias e diversos fatores importantes para a função epidimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides. A secreção de fluido também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando a mesma envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como as células peritubulares mióides, de Leydig e musculares lisas dos vasos (Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007).

Ainda em relação às células de Sertoli, merece ser ressaltado que diversos estudos mostram que o número destas células por testículo é o principal fator na determinação da magnitude da produção espermática e do tamanho do testículo (Hess *et al.*, 1993; Sharpe, 1994; França *et al.*, 1995; Hess & França, 2007). Tal pressuposto baseia-se no fato de que as células de Sertoli têm capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie, e que a população deste tipo celular mantém-se estável após a puberdade (França & Russell, 1998; Sharpe *et al.*, 2003), não havendo também alteração no seu número ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero (Wing & Chistensen, 1982).

Em relação ao compartimento intertubular seus componentes são as células de Leydig, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell *et al.*, 1990). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica (%), dos diferentes componentes do compartimento intertubular, a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente neste compartimento (Fawcett *et al.*, 1973; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007).

De acordo com trabalho realizado por Fawcett *et al.* (1973) e posteriormente revisado por Russell (1996), o arranjo e a proporção dos elementos constituintes do espaço intertubular seguem três padrões distintos: (I) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área relativamente pequena no espaço intertubular, contrastando com extensos sinusóides e espaços linfáticos, conforme observado em ratos, camundongos, hamsteres, chinchilas e guineas pig; (II) espécies



que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo que é drenado por vasos, arranjo este observado em bovinos, ovinos e primatas, incluindo-se o homem; e (III) espécies nas quais abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o espaço intertubular, apresentando muito pouco tecido conjuntivo e linfáticos, conforme visto em suídeos e zebras. Embora estes três padrões tenham sido preconizados, merece ser citado que número ainda bastante pequeno de espécies de mamíferos foi investigado neste aspecto e, muito provavelmente, outros padrões ou mesmo variações dos mesmos devem existir (Russell, 1996).

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir do colesterol (Bardin, 1996). Esta produção de andrógenos ocorre através de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana citoplasmática das células de Leydig. À semelhança do FSH, o LH é uma glicoproteína sintetizada e secretada na adenohipófise sob a influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo. O controle “feedback” negativo do LH é exercido principalmente pelos esteróides (testosterona e estrógenos) tanto na adenohipófise quanto no hipotálamo (Shupnik & Schreihof, 1997). Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, células peritubulares mióides, musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (Suárez-Quian *et al.*, 1999). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelleniemi *et al.*, 1996) e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e a manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin *et al.*, 1994; De Gendt *et al.*, 2004). Particularmente, a diidrotestosterona é considerada como o principal andrógeno responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Fan & Robaire, 1998; Goyal *et al.*, 1999).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998). O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo, perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por

testículo (Bascom & Ostrud, 1925). Já em porcos domésticos existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 5000 metros de túbulos no total (França & Russell, 1998). De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está na faixa de 180µm a 300µm (Roosen-Runge, 1977).

### **1.3. Processo espermatogênico**

A espermatogênese é um processo altamente complexo e bem organizado e que dura cerca de 40 a 60 dias na maioria das espécies de mamíferos já investigados (França & Russell, 1998; França *et al.*, 1998; Hess & França, 2007). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três etapas: fase espermatogonial ou mitótica, fase espermatocitária ou meiótica e fase espermiogênica ou de diferenciação (Russell *et al.*, 1990; Sharpe, 1994).

A fase espermatogonial é caracterizada pela auto-renovação e diferenciação das espermatogônias, gerando células “amplificadoras” e de reserva ou células comprometidas com a diferenciação. Estas células mais diferenciadas dão continuidade ao processo espermatogênico e um intrincado processo de diferenciação e proliferação ocorre até a última divisão mitótica que originará os espermatócitos primários (pré-leptótenos), dando assim início à fase espermatocitária (de Rooij & Russell, 2000). Nesta etapa, ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e a segregação dos cromossomos homólogos. Ao final desta longa fase, prófase I, subdividida em pré-leptóteno/leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, os espermatócitos secundários serão formados. Após a segunda divisão meiótica, estes espermatócitos secundários darão origem a células haplóides denominadas espermátides (Russel *et al.*, 1990; Hess & França, 2007). Estas espermátides constituem a fase espermiogênica na qual, através de um complexo processo de diferenciação, que inclui a formação do acromossomo e do flagelo e a compactação do DNA (substituição das histonas por protaminas), as espermátides arredondadas se alongam para originar os espermatozóides. Estes últimos, após passarem pelo

processo de maturação no epidídimo, estarão aptos a fertilizarem o oócito (Russel *et al.*, 1990; Hess & França, 2007).

#### **1.4. Biologia espermatogonial**

Para manter o intrincado processo espermatogênico e a homeostase testicular, os metazoários contam com importantes populações de células tronco germinativas denominadas espermatogônias (de Rooij & Russell, 2000). Num período variado da vida pós-natal, as espermatogônias tronco originam-se de células precursoras mais indiferenciadas denominadas gonócitos (McGuinness & Orth, 1992). Estes últimos são originados das células germinativas primordiais que migram do epiblasto, localizado próximo ao mesoderma extra-embrionário, em direção a crista urogenital, onde irão fazer parte da gônada primitiva (Bendel-Stenzel *et al.*, 1998; Ross & Capel, 2005). Vários estudos têm demonstrado a existência de populações distintas de gonócitos em camundongos. Uma destas populações daria origem às espermatogônias comprometidas com a diferenciação, sendo responsáveis pela primeira onda espermatogênica, enquanto a segunda população de gonócitos originaria espermatogônias tronco com a função de atuar como células “amplificadoras” e de reserva, responsáveis pela manutenção do processo espermatogênico ao longo da vida do animal (Orwig *et al.*, 2002; Hess & França, 2007).

À semelhança do que ocorre em outras populações de células tronco adultas, as espermatogônias são capazes de sofrer diferenciação e auto-renovação. Existem cerca de nove gerações de espermatogônias em ratos e camundongos (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000). Estas gerações são divididas em três classes de espermatogônias denominadas do tipo A, intermediárias (In) e do tipo B. As espermatogônias do tipo A são classicamente subdivididas em indiferenciadas [A isolada ( $A_s$ ), A pareada ( $A_{pr}$ ) e A alinhada ( $A_{al}$ )] e diferenciadas  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$ . As espermatogônias intermediárias (In) e do tipo B também são consideradas diferenciadas e em determinadas espécies (por exemplo em ruminantes e primatas) as espermatogônias do tipo B podem apresentar duas ou mais gerações (De Rooij & Russell, 2000). Quando as espermatogônias mais iniciais sofrem divisões mitóticas, as mesmas permanecem conectadas entre si através de pontes citoplasmáticas,

formando clones ou cistos espermatogoniais cada vez maiores, dependendo do número de divisões. Tomando-se como ponto de referência a manutenção dos clones espermatogoniais, as  $A_s$  foram caracterizadas como a população de espermatogônias tronco mais basal (De Rooij & Russell, 2000). Assim, o início da espermatogênese ocorre com a diferenciação das espermatogônias tronco, resultando em células filhas ( $A_{pr}$ ) que sofrem uma série de divisões mitóticas originando  $A_{al}$  (4),  $A_{al}$  (8) e  $A_{al}$  (16). Clones espermatogoniais com 8, 16 ou mais células diferenciam-se (sem ocorrer divisão mitótica) em espermatogônias  $A_1$  e em seguida, ocorre uma série de divisões mitóticas, resultando na formação das espermatogônias  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$ , consecutivamente. As espermatogônias  $A_4$  dão origem a espermatogônias intermediárias e estas originarão as do tipo B, que por sua vez formarão os espermátocitos primários em pré-leptóteno (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Van Pelt, 2003).

As espermatogônias  $A_{pr}$  e  $A_{al}$ , que em tese estão mais comprometidas com a diferenciação e a formação de espermatozoides, podem romper suas pontes citoplasmáticas e comportarem-se como espermatogônias tronco, quando transplantadas em testículos de animais receptores ou mesmo quando os testículos sofrem injúrias severas (de Rooij & Grootegoed 1998; Nakagawa *et al.*, 2010). Neste contexto funcional, as espermatogônias tronco  $A_s$  podem ser denominadas de espermatogônias tronco verdadeira, enquanto as espermatogônias  $A_{pr}$  e  $A_{al}$  seriam as espermatogônias tronco potencial (Nakagawa *et al.*, 2010).

O avanço atual de técnicas moleculares e a caracterização de marcadores específicos têm ampliado o conhecimento acerca da biologia das espermatogônias (Figura 2) e também propiciado maior eficiência no isolamento destas células. Neste sentido, para a marcação específica de espermatogônias tronco grande destaque tem sido dado ao receptor de GDNF (glial cell line-derived neurotropic factor), o  $GFR\alpha-1$  (GDNF factor receptor  $\alpha-1$ ), que já está relativamente bem caracterizado, principalmente em roedores (Hofmann *et al.*, 2005). Outros marcadores específicos também têm sido caracterizados para estas células como PLZF (Promyelocytic leukaemia zinc finger protein; Buaas *et al.*, 2004; Costoya *et al.*, 2004), Neurogenina 3 (Yoshida *et al.*, 2004), THY-1 (Thymus cell antigen 1; Reding *et al.*, 2010) e o receptor CSF-1 (Colony stimulating factor-1; Oatley *et al.*, 2009) e mesmo outros descritos na

Figura 2. Quanto as espermatogônias diferenciadas, o marcador mais utilizado tem sido o receptor c-KIT (Tirosine kinase receptor), que se expressa em todos os tipos de espermatogônias diferenciadas, além de ser muito conservado evolutivamente entre as diferentes espécies (Schrans-Stassen *et al.*, 1999).

### **1.5. Nicho de células tronco espermatogoniais**

Na maioria dos sistemas auto-renováveis, a função das células tronco adultas é garantida por microambientes denominados nichos que regulam, provavelmente através de estímulos extrínsecos, o controle da auto-renovação e diferenciação destas células, com a participação do suporte cito-arquitetural de vários elementos celulares e da produção de diversos fatores específicos (Vong & Jones, 2010). Estes nichos de células tronco têm sido muito estudados em vários sistemas nos quais ocorre alta taxa de renovação celular, como por exemplo, na epiderme (Li & Clevers, 2010; Yang & Peng, 2010), no intestino (Haegebarth & Clevers, 2009), na medula óssea (Vong & Jones, 2010), em ovário e testículos de invertebrados (Pałasz & Kamiński, 2009), e testículos de mamíferos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2007; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; do Nascimento *et al.*, 2009). De forma genérica e funcional, os nichos de células tronco são definidos como o microambiente que mantém o destino destas células indiferenciadas. Desta forma, os mesmos são compostos pelas próprias células tronco, células diferenciadas adjacentes e matriz extracelular (Hofmann, 2005; Caires *et al.*, 2010). Nos testículos de algumas espécies de mamíferos, como por exemplo camundongos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001), ratos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2003), hamsteres (do Nascimento *et al.*, 2009) e jumentos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2009), foi descrito que as espermatogônias tronco têm localização preferencial em “nichos” situados na região do túbulo seminífero adjacente ao interstício.

O principal componente dos nichos espermatogoniais são provavelmente as células de Sertoli, as quais atuam principalmente através da sinalização por GDNF. Estudos *in vitro* têm demonstrado que este fator é essencial para a proliferação e auto-renovação espermatogonial (Kokkinaki *et al.*, 2009). Assim, Oatley *et al.* (2006) cultivaram espermatogônias tronco em meio definido (livre de soro fetal bovino)

enriquecido com GDNF, GFR $\alpha$ -1 solúvel e bFGF (Basic fibroblast growth factor). Ao se remover o GDNF do cultivo foram observadas alterações morfológicas, como por exemplo a perda de pontes intercelulares, alterando o padrão de clones espermatogoniais. Em estudo semelhante, Lee *et al.* (2007) verificaram que a retirada do GDNF levou a redução do número de espermatogônias. No entanto, é difícil saber *in vivo* se a perda da sinalização por GDNF influi diretamente na diferenciação de espermatogônias tronco ou se outros fatores estariam envolvidos neste processo. Em estudo bastante elegante desenvolvido recentemente, Nakagawa e colaboradores (2010) demonstraram que as espermatogônias de camundongos que apresentam maior expressão de receptor do GDNF (GFR $\alpha$ 1) constituem a população mais basal de espermatogônias. Observando-se o padrão de proliferação e diferenciação espermatogonial em camundongos tratados com busulfan, foi notado que estas espermatogônias GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> estão comprometidas com a reconstituição da espermatogênese após injúria (Nakagawa *et al.*, 2010).

À semelhança de outros sistemas de células tronco adultas (ex.: folículo piloso, medula óssea, intestino), a associação do nicho de células tronco com a vascularização também foi relatada em testículos de camundongos. Assim, utilizando camundongos transgênicos expressando GFP sob o controle da seqüência regulatória para neurogenina-3, Yoshida *et al.* (2007) observaram, através de microscopia intra-vital, que espermatogônias indiferenciadas possuem localização preferencial por regiões de maior vascularização adjacentes ao espaço intertubular. Estes mesmos autores também relataram que as espermatogônias diferenciadas migram desta região de maior vascularização e assumem padrão de distribuição aleatória ao longo do túbulo seminífero. Portanto, a íntima associação das espermatogônias tronco com a vascularização sugere fortemente a importância de fatores transportados pelo sangue, ou emanados das células intersticiais, na manutenção e diferenciação destas espermatogônias.

Em relação ao papel das células intersticiais, pelo fato das espermatogônias indiferenciadas estarem preferencialmente localizadas na proximidade do compartimento intertubular, onde as células de Leydig é o tipo celular predominante, a participação destas células esteroideogênicas no nicho espermatogonial foi fortemente sugerida (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003; Yoshida

*et al.*, 2007; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; do Nascimento *et al.*, 2009). Particularmente, pelo fato de já ser bem estabelecido o importante papel das células de Leydig na regulação do processo espermatogênico (Ryu *et al.*, 2006). Além disso, receptores de andrógenos são expressos nas próprias células de Leydig, células de Sertoli e peritubulares mióides, células estas consideradas reguladores em potencial dos nichos espermatogoniais (Walker & Cheng 2005). No entanto, o mecanismo molecular de atuação dos andrógenos nas células germinativas, provavelmente através das células somáticas (em particular células de Sertoli), não está ainda estabelecido (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2004).

Em trabalho realizado por Johnston *et al.* (2001), no qual células germinativas provenientes de camundongos mutantes para a expressão de receptor de andrógeno foram transplantadas para camundongos selvagens, foi demonstrado que estas células foram capazes de formarem espermatozóides férteis, restaurando assim completamente a espermatogênese. Assim, sugerindo fortemente que as células germinativas não precisam expressar receptores de andrógenos para se diferenciar. Já em estudos desenvolvidos por Shetty *et al.* (2001), mostrando que camundongos que sofreram danos citotóxicos à espermatogênese apresentaram bloqueio na proliferação espermatogonial, foi observada correlação negativa entre o índice de diferenciação espermatogonial e a concentração de testosterona intra-testicular. Recentemente, com o objetivo de melhor compreender a atuação da testosterona na proliferação espermatogonial, Zhang *et al.* (2007) realizaram o transplante de espermatogônias de ratos GFP inférteis, que sofreram radiação, para diferentes animais receptores. Estas espermatogônias transplantadas para testículos de camundongos imunodeficientes foram capazes de colonizar e se diferenciar em espermatozóides nos animais receptores, sugerindo que o bloqueio da diferenciação ocorrida em testículos de ratos irradiados foi provavelmente devido à danos nas células somáticas envolvidas na manutenção do nicho espermatogonial e não nas células germinativas. Neste mesmo trabalho, através do transplante de espermatogônias de testículos de ratos irradiados para receptores não irradiados e irradiados, foi observada a necessidade de supressão da testosterona para a colonização de testículos dos receptores irradiados, mas não para os do grupo controle. Novamente, estes resultados sugeriram fortemente que a testosterona atua como fator inibidor da diferenciação espermatogonial em ratos. Em

conjunto, os trabalhos acima mencionados permitem inferir que, se as células de Leydig são eventualmente importantes para a função do nicho espermatogonial, esta importância provavelmente seria inibitória.

Por outro lado, uma vez que o declínio da concentração intratesticular de testosterona está diretamente relacionado com a senescência reprodutiva, diferentes correlações têm sido feitas entre nicho espermatogonial, testosterona e diferenciação, (Midzak *et al.*, 2009). Assim, Ryu *et al.* (2006) observaram que camundongos com 15 meses de idade apresentam mais de 70% dos túbulos seminíferos com problemas na espermatogênese. Estes autores observaram ainda que, quando espermatogônias de animais entre 12 a 24 meses de idade foram transplantadas para animais jovens, as mesmas mantinham sua capacidade de colonizar e se diferenciar, apesar da idade. Portanto, foi sugerido que a senescência reprodutiva estaria relacionada à deficiência do nicho espermatogonial em regular a auto renovação e a diferenciação. Considerando que com o aumento da idade as células de Leydig decrescem sua produção de testosterona (Midzak *et al.*, 2009), correlação entre os andrógenos e estas células com os nichos espermatogoniais foi atribuída. No entanto, o mecanismo pelo qual as células de Leydig atuam neste processo permanece ainda inconclusiva e a participação de outros elementos do compartimento intertubular ou intersticial no nicho espermatogonial, ou mesmo uma intrincada regulação parácrina, não deve ser descartada.

A comunicação entre as células de Leydig e espermatogônias tronco foi também demonstrada recentemente em camundongos através de fatores solúveis (Kokkinaki *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2009). Nestes trabalhos, foi observado que espermatogônias tronco ( $A_s$ )  $GFR\alpha 1^+$  (Kokkinaki *et al.*, 2009) ou  $THY-1^+$  (Oatley *et al.*, 2009) apresentam a expressão do receptor do fator estimulador de colônias-1 (Colony stimulating factor-1 receptor; CSF-1r). Em ambos estudos, notou-se a produção do CSF-1 pelas células peritubulares mióides e células de Leydig (Kokkinaki *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2009). Também foi demonstrado, através de avaliações *in vitro*, a sinalização deste fator para a proliferação (Kokkinaki *et al.*, 2009) e auto-renovação espermatogonial (Oatley *et al.*, 2009), indicando portanto a íntima associação das espermatogônias indiferenciadas com as células peritubulares mióide.



**2. JUSTIFICATIVA  
E  
OBJETIVOS**

## **2. Justificativa e Objetivos**

### **2.1. Justificativa**

Estudos recentemente desenvolvidos em nosso laboratório (Costa, 2009; Costa *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011) demonstraram que a morfologia das células germinativas e a organização dos diferentes estádios da espermatogênese em catetos apresentaram-se muito semelhantes aos de porcos domésticos e javalis. Reforçando assim o aspecto evolutivamente conservado deste processo em mamíferos. No entanto, nestes mesmos estudos foi observado que os catetos apresentam cito-arquitetura testicular ímpar dentre as espécies de mamíferos investigadas até o presente momento. Particularmente, foi notado que as células de Leydig em catetos formam cordões celulares que delimitam externamente os lóbulos testiculares onde se encontram os túbulos seminíferos. Desta forma, considerando esta característica singular, os catetos podem ser considerados como modelo experimental bastante interessante para se investigar o papel das células de Leydig e/ou de fatores produzidos pelas mesmas, na constituição e regulação das espermatogônias tronco e dos nichos espermatogoniais em mamíferos. Pois, através desta característica torna-se possível categorizar as secções de túbulos seminíferos em regiões adjacentes a outros túbulos e ao interstício/compartimento intertubular com ou sem células de Leydig.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo geral**

Avaliar a cito-arquitetura do testículo de catetos (*Tayassu tajacu*) com ênfase nas células de Leydig e a influência destas na cinética espermatogonial e estabelecimento de nichos de espermatogônias tronco através de análises morfofuncionais, estereológicas e de imunocitoquímicas.

#### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Utilizar marcadores específicos (3 $\beta$ -HSD) bem estabelecidos na literatura para as células de Leydig, com a finalidade de se investigar mais detalhadamente a

distribuição das mesmas ao redor dos túbulos seminíferos, avaliando cortes espessos do parênquima testicular por composição de série Z através de microscopia de dois fótons, além da realização de análises morfométricas.

- Caracterizar o ciclo do epitélio seminífero, com base no desenvolvimento do sistema acrossômico, e analisar a frequência de cada estágio. Esta caracterização fornecerá subsídios para se investigar a localização e as interações entre os diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero;
- Caracterizar os diferentes tipos de espermatogônias (indiferenciadas e diferenciadas) desta espécie com base no padrão de heterocromatina, morfologia nucleolar e volume nuclear, através de microscopias de luz e imunohistoquímica;
- Caracterizar marcadores moleculares específicos para espermatogônias troncoais como GFR $\alpha$ -1, CSF-1r, através de imunohistoquímica, como forma de se estabelecer os tipos celulares envolvidos no nicho espermatogonial e qual a possível sinalização para o processo de auto-renovação espermatogonial;
- Analisar a distribuição dos diferentes tipos de espermatogônias, ao longo de cada secção transversal do túbulo seminífero, com a finalidade de se investigar se as mesmas apresentam localização preferencial. Caso isto seja positivo, verificar se ocorre distribuição preferencial das espermatogônias indiferenciadas por regiões com vasos sanguíneos, através da quantificação destes tipos celulares em regiões com presença e ausência de vasos.

# **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais experimentais

Foram utilizados no total 18 catetos (*Tayassu tajacu*) machos, sexualmente maduros, provenientes da Embrapa Amazônia Oriental, localizada no Município de Belém, PA e da Fazenda Engenho d'Água, município de Ouro Preto, MG. Destes animais, 8 foram utilizados para análises morfológicas através de microscopia de luz e 6 para as análises de imunohistoquímica e 4 para western blotting. Este estudo fez parte de um projeto mais amplo desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG e que já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal – CETEA-UFMG (Protocolo de N<sup>o</sup> 070/2005).

#### 3.2. Coleta, processamento dos testículos

Os animais utilizados foram pesados e, em seguida, orquiectomizados segundo técnica rotineira. Imediatamente após a orquiectomia, os testículos direito e esquerdo foram separados do respectivo epidídimo e pesados. Após esta etapa, fragmentos do parênquima testicular, com até 2 mm de espessura, foram coletados próximo à albugínea testicular, sendo então fixados por imersão em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato ou cacodilato a 0,05M e pH 7,4, onde permaneceram por período de 12 horas, à 4°C. Posteriormente, estes fragmentos foram colocados no mesmo tampão e armazenados em geladeira até o momento da inclusão.

Os fragmentos de parênquima testicular foram desidratados em série crescente de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica). Com navalha de vidro, e em micrótomo Leica RM-2165, foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura, os quais foram corados com azul de toluidina-borato de sódio. Para estudos morfológicos, morfométricos foram utilizados microscópios Olympus BX41 e BX-60IV. A documentação fotográfica também foi realizada utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX-60IV com lentes U-PlanApocromáticas, sistema de vídeo câmara digital Q-Color 3 da Olympus e o sistema de análise de imagens da Image-Pro Express da MediaCybernetics.

### **3.3. Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero através do sistema acrossômico**

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero de catetos foram caracterizados de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico das espermátides (Russel *et al.*, 1990). Tendo pontos de referência, a formação e coalescência de vesículas acrossômicas, formação do capuz acrossômico sobre o núcleo e alongamento das espermátides, bem como associações das espermátides com outras células germinativas, tais como espermatogônias e espermatócitos.

### **3.4. Caracterização dos tipos espermatogoniais**

Os fragmentos de testículos coletados e fixados, conforme descrito no item 3.2, foram pós-fixados com ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1% + ferrocianeto de potássio a 1,5%, em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4) por 90 minutos, e acetato de uranila a 3% por 24 horas. Após desidratação em álcoois e passagens por acetona, os fragmentos foram incluídos em resina araldite. Cortes semi-finos de 1 µm foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM2165, colocados em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1%. Estes cortes foram avaliados por microscopia de luz para caracterização dos tipos espermatogoniais. Em cada estágio do ciclo do epitélio seminífero caracterizado no presente estudo foram adquiridas cerca de 20 imagens para cada tipo de espermatogônia presente. Estas espermatogônias foram agrupadas por estágio e classificadas de acordo com suas características morfológicas, sendo utilizados os seguintes parâmetros: morfologia nuclear, presença e disposição de heterocromatina, granulosidade da eucromatina e morfologia e compactação nucleolar (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009). Em seguida, cada um dos tipos espermatogoniais, previamente classificados, foram avaliados quanto ao volume nuclear e 20 espermatogônias de cada tipo foram mensuradas, por animal.

### **3.5. Análise da distribuição das espermatogônias**

Com a finalidade de se avaliar a distribuição das espermatogônias, dez secções transversais de túbulos seminíferos de cada estágio, caracterizados pelo sistema acrossômico, foram fotografadas e subdivididas em três regiões definidas da seguinte forma: a) adjacente a outro túbulo (Túbulo-Túbulo ou T-T); b) adjacente ao interstício sem células de Leydig (Túbulo-Interstício ou T-I); e c) adjacente ao interstício contendo células de Leydig (Túbulo-Célula de Leydig ou T-CL). Nestas três diferentes regiões tubulares, foram avaliados os números de espermatogônias ( $A_{und}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In e B) por grau (partindo-se da premissa que o círculo, ou no caso a circunferência tubular, apresenta 360 graus), obtendo-se assim a densidade populacional de cada área.

### **3.6. Imunohistoquímica**

Os fragmentos de parênquima testicular destinados a imunohistoquímica foram fixados por imersão em solução de bouin, por 24 horas. Este material foi desidratado, incluído em paraplast, e secções histológicas com 5  $\mu$ m de espessura foram obtidas. Estas secções foram aderidas em lâminas tratadas com poli-L-lisina, desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol e água destilada. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da incubação dos cortes com solução de água oxigenada ( $H_2O_2$ , 3%), por 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se tampão citrato (pH 6,0) em microondas, com potência máxima, por cinco minutos contados a partir da ebulição. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com Ultra V Block (Dako Envision) por 5 minutos.

Para a imunoperoxidase, após o bloqueio de ligações inespecíficas, as secções histológicas foram incubadas com o anticorpo primário anti-GFR $\alpha$ -1 (Santa Cruz Biotecnologia, SC-6157;1:25) "overnight" à 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com o anticorpo secundário biotilado por uma hora e, em seguida, com solução de estreptavidina (Dako Envision), por 15 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os cortes foram então contra-corados com Hematoxilina de Mayer.

Nas análises de imunofluorescência, as secções histológicas foram desidratadas e submetidas à recuperação antigênica e bloqueio de ligações inespecíficas conforme previamente descrito. Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo primário anti-GFR $\alpha$ -1 (1:25), anti-CSF-1 (Abcam, Ab1324, 1:200), anti-CSF-1r (Abcam, Ab61137, 1:100), anti-3 $\beta$ -HSD (Santa Cruz Biotecnologia, SC-30820; 1:500), ou anti-Vasa (DDX4, Abcam, Ab13840; 1:200) também “overnight” a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor [488 anti-coelho (1:500) e/ou 546 anti-cabra (1:300)] por uma hora, à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão, foi realizada a contra-coloração nuclear com DAPI (Sigma Aldrich), e os cortes foram novamente lavados e as lâminas montadas com solução de Mowiol 4-88 (Merck). Secções histológicas de testículos de camundongos adultos foram utilizadas como controle positivo, enquanto no controle negativo o anticorpo primário foi substituído por PBS (omissão do anticorpo primário). Após esta etapa, as lâminas foram analisadas para se investigar os tipos celulares marcados, bem como a localização dos mesmos nas diferentes regiões investigadas dos túbulos seminíferos.

### **3.7. Série Z**

Para a reconstrução tridimensional (3D) do parênquima testicular de catetos foi realizada imunofluorescência (conforme descrito no item 3.6) em cortes espessos (300  $\mu$ m de espessura, os quais foram fixados em paraformaldeído a 4%. As células de Leydig foram marcadas com anticorpo para 3 $\beta$ -HSD, enzima expressa apenas nas células de Leydig, e DAPI como contra-coloração nuclear. Após os procedimentos acima descritos, os cortes espessos foram avaliados por microscopia de dois fótons, no Laboratório de Biofotônica, do Departamento de Física do ICEx/UFMG. Nesta avaliação, como fonte de excitação em 780nm, foi utilizado laser de safira:titânio e as imagens obtidas a cada 5  $\mu$ m de espessura do tecido (série Z) foram reconstruídas com auxílio do software *Image J* e armazenadas em formato de vídeo.



### **3.8. Western Blotting**

A técnica de western blotting foi utilizada para se avaliar a presença de proteínas GFR $\alpha$ -1, CSF-1 e CSF-1r no parênquima testicular de catetos. Com este objetivo, amostras do parênquima testicular de cada animal foram congeladas separadamente em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C. Desta amostra total, fragmentos de 300 mg de cada animal foram separados para a extração das proteínas totais presentes. Para tal finalidade, foi adicionada solução de inibição de protease em 0,9% NaCl (Sigma Aldrich), que foi posteriormente homogeneizada e sonicada. Após a sonicação, o lisado tecidual foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e congelado a -80°C.

A seguir, as amostras das proteínas obtidas foram diluídas (1:2) em solução de sódio dodecil sulfato (SDS, Sigma Aldrich), glicerol, 10% de azul de bromofenol em 0,5M de tampão TRIS, pH 6,8, e fervidas por 5 minutos. Após esta etapa, géis em 7,5% de SDS em poliacrilamida foram preparados e inseridos 20  $\mu$ L da amostra de proteínas em cada poço. Padrão (marcador) de peso molecular (Sigma Aldrich) foi utilizado em corridas paralelas às amostras avaliadas. Para a corrida do gel, 100-mA de corrente elétrica foi aplicado. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, por 60 minutos, utilizando-se corrente elétrica de 200-mA. Após o término desta etapa, o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com a incubação da membrana em solução de 1% de BSA (Sigma Aldrich) em PBS, por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-GFR $\alpha$ -1 (1:500), anti-CSF-1 (1:200), anti-CSF-1r (1:200), por 120 minutos, também à temperatura ambiente. Após este período de incubação, as membranas foram lavadas em TBS com 0,05% de Tween por três vezes, com cada banho tendo 5 minutos de duração. Posteriormente, as mesmas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado, por uma hora, sendo em seguida lavadas e incubadas com estreptavidina (Thermo Scientific, TS-125-HR), por 15 minutos. Finalmente, as membranas foram novamente lavadas e reveladas em solução de DAB (Sigma Aldrich), clorofenicol (Sigma Aldrich) e peróxido de hidrogênio (Sigma Aldrich), por cerca de 1 minuto, sendo posteriormente digitalizadas em “scanner” Epson Perfection 4990.

### **3.9. Análises Estatísticas**

Todos os dados quantitativos foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade das variâncias pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. Em caso de distribuição normal, os parâmetros foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As análises dos dados que não seguiram as premissas da ANOVA (distribuição espermatogonial em sub-áreas e distribuição dos clones GFR $\alpha$ -1 positivos) foram realizadas pelo teste de qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas com auxílio dos softwares *GraphPad Prisma 5* e *SAEG*.

## **4. Resultados**

## 4. Resultados

### 4.1. Citoarquitetura testicular baseada no padrão de distribuição das células de Leydig no parênquima testicular

Conforme previamente descrito por Costa *et al.* (2010), os testículos de catetos apresentam padrão de arranjo do compartimento intertubular ainda não descrito para outras espécies de mamíferos. A reconstrução tridimensional utilizando microscopia de multi-fóton de secções com 300 µm de espessura do parênquima testicular, aliada a imunomarcagem com de 3β-Hidroxiase (3β-HSD; enzima específica de células esteroideogênicas), confirmou o arranjo peculiar descrito para as células de Leydig por Costa *et al.* (2010) (Figura 3A-B). Ademais, observamos através de análises morfológicas que as células de Leydig formando cordões celulares ao redor dos túbulos seminíferos representavam cerca de 80% do total de células de Leydig (Figura 3B-C). O volume nuclear das poucas células de Leydig localizadas entre os túbulos seminíferos não diferiu ( $p > 0,05$ ) daquele das células de Leydig presentes no cordão (Figura 3D). Também foi observada maior vascularização ( $p > 0,05$ ) na região do parênquima testicular constituída pelos cordões de células de Leydig (Figura 3E).

### 4.2. Estádios do ciclo do epitélio seminífero caracterizados através do sistema acrossômico

Baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico nas espermatídes, dez estádios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados em catetos, nos quais a fase espermiogênica foi subdividida em 16 passos (Figura 4). Conforme sucintamente descrito, no passo 1 as espermatídes apresentam o Golgi em posição perinuclear e não possuem ainda vesículas acrossômicas visíveis. Posteriormente, dos passos 2 ao 7, ocorre a formação das vesículas acrossômicas que gradualmente tornam-se achatadas e aderem-se a superfície do núcleo das espermatídes arredondadas. Entre os passos 8 e 10 os núcleos das espermatídes alongam-se progressivamente e tornam-se orientados para a base do túbulo seminífero. A partir do passo 10 os núcleos das espermatídes tornam-se completamente achatados e adquirem formato espatular.

Desta forma, no passo 16 o núcleo alonga-se progressivamente e a cromatina torna-se gradativamente mais condensada e estas espermatídes movem-se progressivamente para a borda luminal sendo espermiadas no lúmen tubular, no estágio VI. As frequências de cada estágio do epitélio seminífero caracterizado pelo sistema acrossômica está representada na porção inferior da Figura 4. Conforme pode ser notado, o estágio VI apresenta nitidamente maior frequência (21%), enquanto os estágios III e IV são os menos frequentes (~5%).

### **4.3. Morfologia, volume e cinética espermatogonial**

Os diferentes tipos espermatogoniais observados no epitélio seminífero de catetos foram caracterizados baseados na morfologia nuclear e cinética (proliferação) destes tipos celulares, em associação com os estágios do ciclo do epitélio seminífero (Figura 4) nos quais os mesmos estavam presentes. Assim, através de microscopia de alta resolução (Chiarini-Garcia & Russel, 2001) sete tipos espermatogoniais ( $A_{und}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In, e B) foram descritos, tendo como base o padrão de hetero- e eucromatina, vacuolização nuclear e morfologia nucleolar. Desta forma, a espermatogônia  $A_{und}$  apresentou núcleo mosqueado, granular e bem arredondado e um único nucléolo proeminente e arredondado, não sendo evidenciada heterocromatina. As espermatogônias diferenciadas foram caracterizadas como do tipo A ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$ ), intermediária (In) e do tipo B (Figura 3A). De maneira geral, as espermatogônias diferenciadas do tipo A apresentaram eucromatina leve e finamente granular. Particularmente, a espermatogônia do tipo  $A_1$  apresentou um nucléolo, não havendo a presença de heterocromatina. A do tipo  $A_2$  apresentou aumento na quantidade de heterocromatina, que se encontrava margeando o envoltório nuclear, e a presença de dois nucléolos de tamanhos bem distintos, enquanto nas dos tipos  $A_3$  e  $A_4$  ocorreu aumento progressivo de heterocromatina. Nestes dois últimos tipos de espermatogônias A ( $A_3$  e  $A_4$ ) apenas um nucléolo foi observado e o envelope nuclear apresentava grande irregularidade (Figura 5A).

As espermatogônias In e do tipo B apresentaram o núcleo arredondado e aumento na granulosidade da heterocromatina e eucromatina, conferindo aspecto

granular ao núcleo. Nas espermatogônias In foi observada quantidade intermediária de heterocromatina margeando o envoltório nuclear, enquanto o envoltório nuclear das espermatogônias do tipo B apresentou-se quase completamente margeado por este tipo de cromatina (Figura 5A). Em contraste com as espermatogônias indiferenciadas, que estavam presentes em todos os estádios do ciclo, as espermatogônias diferenciadas foram observadas em estádios específicos (Figura 4). Assim, aquelas dos tipos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub> encontravam-se nos estádios VIII, IX, X e I, respectivamente. Já as espermatogônias In foram observadas nos estádios II, III e IV, enquanto as do tipo B estavam presentes nos estádios V, VI e VII.

Através da utilização de ensaio de imunoperoxidase observou-se que o tipo celular caracterizado morfológicamente como A<sub>und</sub> foi o único que apresentou expressão de GFR $\alpha$ -1 (GFR $\alpha$ -1<sup>+</sup>) no epitélio seminífero (Figura 5B), reforçando assim o potencial de célula tronco (*stemness*) deste tipo celular. Além disso, a análise morfométrica do volume nuclear dos diferentes tipos espermatogoniais de catetos mostrou que as espermatogônias A<sub>und</sub> apresentam volume significativamente maior que aquele dos demais tipos de espermatogônias diferenciadas (Figura 5C; p<0,05). Já em relação às demais espermatogônias do tipo A, não houve diferença para este parâmetro (p>0,05). No entanto, estas espermatogônias apresentaram volume nuclear maior do que as espermatogônias In e do tipo B (Figura 5C, p<0,05). Além disso, também houve redução no volume nuclear das espermatogônias In para aquelas do tipo B (Figura 5C; p<0,05).

Na avaliação da cinética dos diferentes tipos de espermatogônias diferenciadas foi observado que o número destas espermatogônias aumentou gradualmente com a progressão destas células no ciclo (Figura 5D; p<0,05), exceto para a A<sub>3</sub> que não apresentou diferença significativa de seu número quando comparada com a espermatogônia A<sub>2</sub> (Figura 5D; p>0,05). Conforme já foi mencionado, as espermatogônias In e do tipo B são observadas em três estádios específicos do ciclo (II, III e IV; e V, VI e VII, respectivamente). No entanto, estas espermatogônias estabilizam sua população apenas no segundo estágio em que são observadas (Figura 5D; p>0,05). Na avaliação do número de espermatogônias ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, foi observado aumento gradativo de A<sub>und</sub>, sendo este número significativamente maior nos estádios VI e VII (Figura 5D; p<0,05).

#### 4.4. Distribuição espermatogonial

De acordo com as três regiões previamente caracterizadas dos túbulos seminíferos (Figura 6A) e também baseado em critérios morfológicos, foi observado que as espermatogônias  $A_{und}$  apresentaram localização preferencial ( $p < 0.05$ ) pela região T-I (Figura 6B,  $p < 0.05$ ), onde as células de Leydig não são observadas. O tipo espermatogonial  $A_1$  apresentou localização preferencial pelas regiões T-I e T-T (Figura 6B;  $p < 0.05$ ). No entanto, os demais tipos espermatogoniais ( $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , In e B) apresentaram-se aleatoriamente distribuídos ao longo das secções transversais de túbulos seminíferos avaliados (Figura 6B;  $p > 0.05$ ). Particularmente na região T-I, foi observado que espermatogônias  $A_{und}$  localizam-se preferencialmente em áreas onde vasos sanguíneos são observados (Figura 6C;  $p < 0.05$ ).

Conforme mostrado na Figura 7, todas as três regiões (T-T, T-I e T-LC) investigadas foram subdivididas em áreas periféricas (50% do total) e central (50% do total). Nas regiões T-T e T-I, as espermatogônias  $A_{und}$  apresentaram-se localizadas principalmente na área periférica e central, respectivamente (Figura 5A-D). Enquanto as espermatogônias  $A_1$  observadas na região T-LC encontravam-se principalmente na área central (Figura 5E-F;  $p < 0.05$ ). Neste tipo de análise, não foi observada localização preferencial para os demais tipos espermatogoniais (de  $A_2$  a B).

#### 4.5. Fenótipo espermatogonial e imunolocalização de CSF-1

A expressão do receptor de membrana  $GFR\alpha-1$  foi observada através de imunofluorescência nas células de Leydig de catetos, bem como em todas as espermatogônias  $A_{und}$  caracterizadas [ $A_s$  (Figura 8A, B e C),  $A_{pr}$  (Figura 8C),  $A_{al4}$  (Figura 8C) e  $A_{al8}$  (Figura 8D)]. A presença deste receptor  $GFR\alpha-1$  (~47 KDa) foi confirmada através da técnica de Western blotting (Figura 8E). Já na distribuição das espermatogônias  $GFR\alpha-1^+$  verificou-se a existência de localização preferencial ( $p < 0.05$ ) de espermatogônias  $A_s$  e  $A_{pr}$  nas regiões adjacentes ao compartimento intertubular sem células de Leydig (T-I; Figura 8E). De modo interessante, clones espermatogoniais  $GFR\alpha-1^+$  com 4 ou 8 células ( $A_{al4}$  e  $A_{al8}$ ) foram observados principalmente nas regiões em contato com as células de Leydig (T-LC,  $p < 0.05$ ; Figura 8F).

Conforme demonstrado na Figura 9, a expressão do receptor de CSF-1 (CSF-1r) foi observada em todas as espermatogônias A indiferenciadas [ $A_s$ , Figura 9A e D;  $A_{pr}$ , Figura 9A, B e D; e  $A_{al4}$  e  $A_{al8}$  Figura 9A, B, C e D], bem como nas células de Leydig (Figure 9A, C e D). No entanto, a produção do fator CSF-1 (ligante) foi observada tanto nas células de Leydig quanto nas células peritubulares mióide (Figura 9E-F). Além disso, através de dupla marcação para GFR $\alpha$ -1 e CSF-1r, foi notado que todas as espermatogônias GFRA1<sup>+</sup> também expressam CSF-1r (Figura 9A-D). Finalmente, a presença da proteína CSF-1 (~30 KDa) e do seu receptor de membrana CSF-1r (~130 KDa) foi confirmada no parênquima testicular de catetos através de Western blotting (Figura 9G).



## **5. Discussão**

## 5. Discussão

Em trabalhos recentemente publicados em nosso laboratório, foi relatado que catetos apresentam arranjo peculiar das células de Leydig que se apresentam envolvendo lóbulos de túbulos seminíferos (Costa *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). Baseado neste arranjo ímpar, no presente estudo, os catetos foram utilizados como um modelo experimental para se compreender o papel das células de Leydig na regulação da biologia e nicho espermatogonial. Neste sentido, inicialmente foi realizada investigação mais detalhada da cito-arquitetura das células de Leydig, além de se caracterizar o ciclo do epitélio seminífero baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico nas espermatídes. Estas análises prévias, aliadas a estudos morfométricos e de imuno-marcação, nos permitiram descrever os diferentes tipos espermatogoniais e a localização destas células nas três diferentes regiões das secções transversais de túbulos seminíferos consideradas (T-T, T-I e T-LC). Além disso, baseado na distribuição das espermatogônias  $A_{und}$  ( $GFR\alpha-1^+$ ), os resultados obtidos nos permitiram sugerir fortemente que as células de Leydig desempenham importante papel na diferenciação espermatogonial. Finalmente, conforme será discutido adiante em maiores detalhes, nossos resultados referentes à sinalização CSF-1/CSF-1r sugerem que as células peritubulares mióides também tem importante participação no nicho espermatogonial.

O único relato existente na literatura, referente ao arranjo e distribuição das células de Leydig no parênquima testicular de diversas espécies de mamíferos (Fawcett *et al.*, 1973; revisado por Russell, 1996), indica a existência de três diferentes padrões de arranjo destas células (descritos detalhadamente no item 1.1). Dentre as espécies avaliadas quanto a este parâmetro, os suínos e eqüídeos apresentam o padrão III, com abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupando quase todo o espaço intertubular. No entanto, apesar de catetos apresentarem proporção volumétrica (%) de células de Leydig similar a observada em suínos, estes animais apresentam padrão de distribuição destas células esteroideogênicas diferente do padrão III descrito por Fawcett *et al.*, (1973). Assim, em catetos, as células de Leydig formam cordões celulares que delimitam externamente os lóbulos testiculares onde se encontram os túbulos seminíferos (Costa *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). No presente estudo, em

avaliação feita através de reconstruções tri-dimensionais do parênquima testicular, este arranjo único foi confirmado. Além disso, foi observada maior vascularização dos cordões de células de Leydig quando comparado com regiões do compartimento intertubular sem células de Leydig. Estes resultados sugerem que, à semelhança da literatura que em catetos ocorre íntima comunicação entre as células de Leydig e elementos dos vasos sanguíneos, reforçando achados da literatura que indicam que as células de Leydig podem controlar a angiogênese e o fluxo sanguíneo. Não sendo descartado o papel no controle da vascularização também controlar o número e arquitetura destas células esteroidogênicas (Welsh *et al.*, 2010). Baseado nas semelhanças observadas entre as células de Leydig (morfologia celular, volume nuclear e expressão de 3 $\beta$ -HSD) que apresentam-se formando os cordões e naqueles pouco observados entre túbulos seminíferos, podemos inferir que estas últimas são projeções das células que apresentam-se formando os cordões, aspecto este comprovado através da reconstrução tri-dimensional.

Conforme descrito previamente por Costa e colaboradores (2010 e 2011), a morfologia das células germinativas de catetos são muito semelhantes às de espécies filogeneticamente próximas, como porcos domésticos (França *et al.*, 2005) e javalis (Almeida *et al.*, 2006). No entanto, considerando que em catetos as espermatogônias do tipo B só originam espermátocitos primários em pré-leptóteno após a espermiacção, as associações celulares desta espécie se assemelham mais às de javalis (Almeida *et al.*, 2006), ao passo que as frequências dos estádios pré- e pós-meióticos foi muito próxima nestas três espécies de suiformes (Costa *et al.*, 2010), parâmetro este considerado filogeneticamente conservado em espécies da mesma ordem (França *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010). Com relação à fase proliferativa ou mitótica da espermatogênese, sete tipos espermatogoniais foram caracterizados em catetos (A<sub>und</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In e B), valor este também descrito para porcos domésticos (França *et al.*, 2005), confirmando que o número de gerações espermatogoniais é também determinado filogeneticamente (de Rooij & Russell, 2000; França *et al.*, 2005).

À semelhança do descrito na literatura para outras espécies (de Rooij & Russell, 2000; França *et al.*, 2005; Chiarini Garcia *et al.*, 2009) a avaliação da cinética (proliferação) das espermatogônias diferenciadas mostrou que em catetos também ocorre perda considerável de células espermatogoniais, particularmente dos tipos A<sub>2</sub>

até  $A_4$ . Esta perda deve-se provavelmente ao controle de densidade celular usualmente observada no epitélio seminífero (de Rooij & Russell, 2000; Russell *et al.*, 2002). Já a cinética das espermatogônias  $A_{und}$  em catetos seguiu a mesma tendência relatada para roedores (de Rooij, 1973; Lok *et al.*, 1982; Tegelenbosch & de Rooij, 1993; de Rooij & Russell, 2000), onde maior população de deste tipo celular foi observada em estádios próximos à espermiacção, exatamente antes da ocorrência de diferenciação de  $A_{al}$  para  $A_1$  (de Rooij, 1973; Lok *et al.*, 1982; Tegelenbosch & de Rooij, 1993; de Rooij & Russell, 2000).

No presente estudo, também foi observado que as espermatogônias  $A_{und}$  apresentam notável volume nuclear, quando comparado com os demais tipos espermatogoniais. Essa peculiaridade permitiu identificar de forma mais acurada e segura as espermatogônias  $A_{und}$ . O GDNF produzido pelas células de Sertoli liga-se ao receptor  $GFR\alpha$ -1/Ret expresso nas espermatogônias  $A_{und}$  (Hofmann *et al.*, 2005; Hofmann, 2008). Confirmando a caracterização espermatogonial realizada através de parâmetros morfológicos, as espermatogônias  $A_{und}$  de catetos foram o único tipo espermatogonial a expressar  $GFR\alpha$ -1. O que também nos permite sugerir que este receptor é filogeneticamente conservado, uma vez que é expresso em várias espécies de mamíferos pertencentes a distintas ordens (Gassei *et al.*, 2009; Kokkinaki *et al.*, 2009; Gassei *et al.*, 2010; Davidoff *et al.*, 2001). Além disso, este importante resultado também nos permitiu a realização de análises detalhadas acerca da biologia e nicho espermatogonial em mamíferos.

O papel das células de Sertoli e da membrana basal na manutenção da homeostase do nicho espermatogonial já está bem estabelecido (Hofmann *et al.*, 2005; Hofmann, 2008). No entanto, diversos trabalhos têm sugerido de forma evidente a participação de componentes do compartimento intertubular na manutenção deste microambiente (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; Caires *et al.*, 2010), particularmente dos vasos sanguíneos (Yoshida *et al.*, 2007). No entanto, talvez pelo fato das células de Leydig estarem uniformemente distribuídas no compartimento intertubular de todas as espécies até então investigadas (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2007; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; Caires *et al.*, 2010), a atuação destas células no nicho é difícil de ser estabelecida. Portanto, neste aspecto em

particular, os catetos podem ser considerados como modelo experimental ideal para a compreensão do papel das células de Leydig no nicho espermatogonial. Nossos resultados indicam que as espermatogônias  $A_{und}$  apresentam-se localizadas principalmente nas regiões adjacentes ao compartimento intertubular sem células de Leydig e próximas a vasos sanguíneos. Neste último aspecto em particular nossos achados são semelhantes àqueles relatados na literatura para camundongos (Yoshida *et al.*, 2007), sugerindo que comparado com as células de Leydig, os vasos sanguíneos parecem desempenhar o papel mais relevante na manutenção e estabelecimento do nicho espermatogonial. Reforçando esta hipótese, nas análises morfométricas mais acuradas realizadas em cada região, foi observado que espermatogônias  $A_{und}$  apresentaram localização central na região considerada como nicho (T-I), enquanto na região T-T este tipo celular foi observado principalmente em áreas próximas aquela do nicho (área periférica). Por outro lado na região T-LC as espermatogônias  $A_1$  foram observadas em maior número na região central. Assim, nossos resultados sugerem fortemente que as células de Leydig estão mais relacionadas com a diferenciação espermatogonial ( $A_{al}$  para  $A_1$ ) do que com a manutenção do estado indiferenciado das espermatogônias. De fato, em trabalhos realizados com camundongos foi demonstrado que as espermatogônias indiferenciadas tornam-se comprometidas com a diferenciação quando se distanciam dos vasos sanguíneos (Yoshida *et al.*, 2007). A dinâmica precisa deste processo é difícil de ser elucidada, no entanto, o distanciamento gradual das espermatogônias  $A_{und}$  da região do nicho, observado por Yoshida e colaboradores (2007), corrobora a hipótese de que assim que as células tronco perdem o contato com o nicho, as mesmas tornam-se comprometidas com a diferenciação (Spradling *et al.*, 2001; Sheng *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2010).

No nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro estudo a investigar a distribuição de espermatogônias indiferenciadas juntamente com o fenótipo celular (expressão de  $GFR\alpha-1$ ) em mamíferos. Estendendo e corroborando nossos resultados obtidos a partir de critérios morfológicos, todas espermatogônias  $A_{und}$  ( $A_s$ ,  $A_{pr}$  e  $A_{al4-8}$ ) de catetos apresentam expressão de  $GFR\alpha-1$  e estas células, particularmente  $A_s$  e  $A_{pr}$ , apresentam localização preferencial pela região em contato com o compartimento intertubular sem células de Leydig. No entanto, a pequena população de espermatogônias  $A_{und}$   $GFR\alpha-1^+$  encontradas na região em contato com as células de

Leydig, era constituída principalmente de clones espermatogoniais maiores ( $A_{al4}$  e  $A_{al8}$ ). Já na população de  $A_{und}$   $GFR\alpha-1^+$  observada na região T-T não houve predominância de  $A_s$ ,  $A_{pr}$  ou  $A_{al}$ . Ao que parece, este importante resultado pode ser aplicado a outras espécies de mamíferos e até mesmo a outros grupos de vertebrados (Nóbrega *et al.*, 2010). Além disso, os resultados obtidos no presente estudo a partir de critérios morfológicos, onde as espermatogônias  $A_1$  foram observadas principalmente na área central da região T-LC, corroboram a hipótese de que as células de Leydig e/ou seus produtos regulam a diferenciação espermatogonial. No entanto, levando em consideração a complexidade da homeostase das  $A_{und}$  (Sheng *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2010), e mesmo nossos resultados, estudos mais detalhados devem ser conduzidos com o objetivo de se investigar os fatores e/ou mecanismos que controlam a diferenciação espermatogonial. Particularmente nos aspectos que se referem às interações entre células somáticas testiculares e o complemento de células germinativas, presente nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero.

A diferenciação de  $A_{al}$  para  $A_1$  ocorre nos estádios próximos à espermição, estádios estes, considerados mais andrógeno-dependentes do que os demais (Sharpe *et al.*, 1994; Hess & França, 2007). Talvez não por coincidência, estes estádios apresentam baixos níveis de expressão de GDNF pelas células de Sertoli (Johnston *et al.*, 2011). No entanto, apesar da relação entre o nicho espermatogonial e andrógenos ter sido recentemente sugerida (Caires *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2010), os mecanismos pelos quais a testosterona e/ou seus sub-produtos regulam a função das células somáticas e germinativas no testículo ainda não são conhecidos (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2010). Particularmente, já está bem estabelecido que a existência de receptor de andrógeno nas células germinativas não é necessária para a progressão da espermatogênese em mamíferos (Johnston *et al.* 2001). Por outro lado, a inibição da testosterona promove a auto-renovação espermatogonial e melhor colonização destas células após o transplante de células germinativas em camundongos (Ogawa *et al.*, 1998; Dobrinski *et al.*, 2001). Em zebrafish, foi observado que o aumento dos níveis de testosterona intra-testiculares e da expressão de genes relacionados à esteroidogênese resultam em micro-ambiente pro-diferenciação, onde após o transplante de espermatogônias, estas se diferenciam rapidamente, provavelmente sem a ocorrência de auto-renovação (Nóbrega *et al.*, 2010). Em

conjunto, estes achados da literatura corroboram nossos resultados, sugerindo fortemente a atuação das células de Leydig na diferenciação espermatogonial.

Em camundongos, foi recentemente sugerida a atuação das células de Leydig no processo de auto-renovação espermatogonial, que ocorre provavelmente através de fatores solúveis pela via de sinalização CSF-1/CSF-1r (Kokkinaki *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2009). Assim estes autores observaram a expressão de CSF-1 pelas células de Leydig e peritubulares mióide. No presente estudo, resultados semelhantes confirmados através de Western blotting foram observados em catetos. Além disso, sugerindo que em catetos o CSF-1 também apresenta importante papel no nicho espermatogonial, a expressão do receptor de CSF-1 (CSF-1r) foi observada em todas as espermatogônias GFR $\alpha$ -1 positivas ( $A_s$ ,  $A_{pr}$ ,  $A_{al4}$ , e  $A_{al8}$ ). Como o CSF-1 é produzido pelas células de Leydig e peritubulares mióide, e na região por nós considerada como nicho as células de Leydig são pouco freqüentes, podemos inferir que as células peritubulares mióide são as células somáticas que provavelmente estão envolvidas na regulação do nicho e auto-renovação espermatogonial. Hipótese esta confirmada através de ensaios *in vitro* desenvolvidos em camundongos (Kokkinaki *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2009).

Os principais resultados encontrados no presente estudo estão sumarizados na Figura 10. Considerando a cito-arquitetura testicular única observada em catetos e utilizando critérios morfológicos e de imuno-marcação para GFR $\alpha$ -1 e CSF-1/ CSF-1r, foi observado que as espermatogônias  $A_{und}$  (principalmente  $A_s$  e  $A_{pr}$ ) apresentam localização preferencial pela região em contato com o compartimento intertubular sem células de Leydig, sugerindo fortemente que, pelo menos diretamente, o nicho espermatogonial não é dependente de células de Leydig, mas de fatores emanados do compartimento intertubular e/ou dos componentes dos vasos sanguíneos. Pelo fato dos clones espermatogoniais maiores ( $A_{al-4-8}$ ) terem sido observados em regiões próximas às células de Leydig, esses resultados sugerem que as mesmas provavelmente desempenham importante papel na regulação do comprometimento de espermatogônias com a diferenciação ( $A_{al}$  para  $A_1$ ). Conforme também ilustrado na Figura 10, através da expressão de CSF-1, as células peritubulares mióides parecem desempenhar importante papel na manutenção do nicho espermatogonial.

# **Conclusões**



## 6. Conclusões

O arranjo ímpar das células de Leydig em catetos permitiu que esta espécie de suiforme fosse utilizada no presente estudo com o objetivo de melhor compreender o papel destas células esteroidogênicas na regulação da biologia e nicho espermatogoniais. A investigação detalhada da cito-arquitetura das células de Leydig, aliada a caracterização do ciclo do epitélio seminífero baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico, nos permitiu descrever os diferentes tipos espermatogoniais e a localização destas células nas três diferentes regiões das secções transversais de túbulos seminíferos consideradas [túbulo-túbulo (T-T); túbulo-interstício (T-I); e túbulo-CL (T-CL)]. Imunomarcações das espermatogônias e dos principais elementos somáticos do testículo para  $GFR\alpha-1$  e  $CSF-1/CSF-1r$  também foram realizadas. De maneira geral, os resultados encontrados no presente estudo nos permitem as seguintes conclusões:

1- O arranjo único das células de Leydig no parênquima testicular foi confirmado através da avaliação feita em reconstruções tri-dimensionais do parênquima testicular e, comparado com regiões do compartimento intertubular/intersticial sem células de Leydig, nos cordões formados por estas células foi observada maior vascularização.

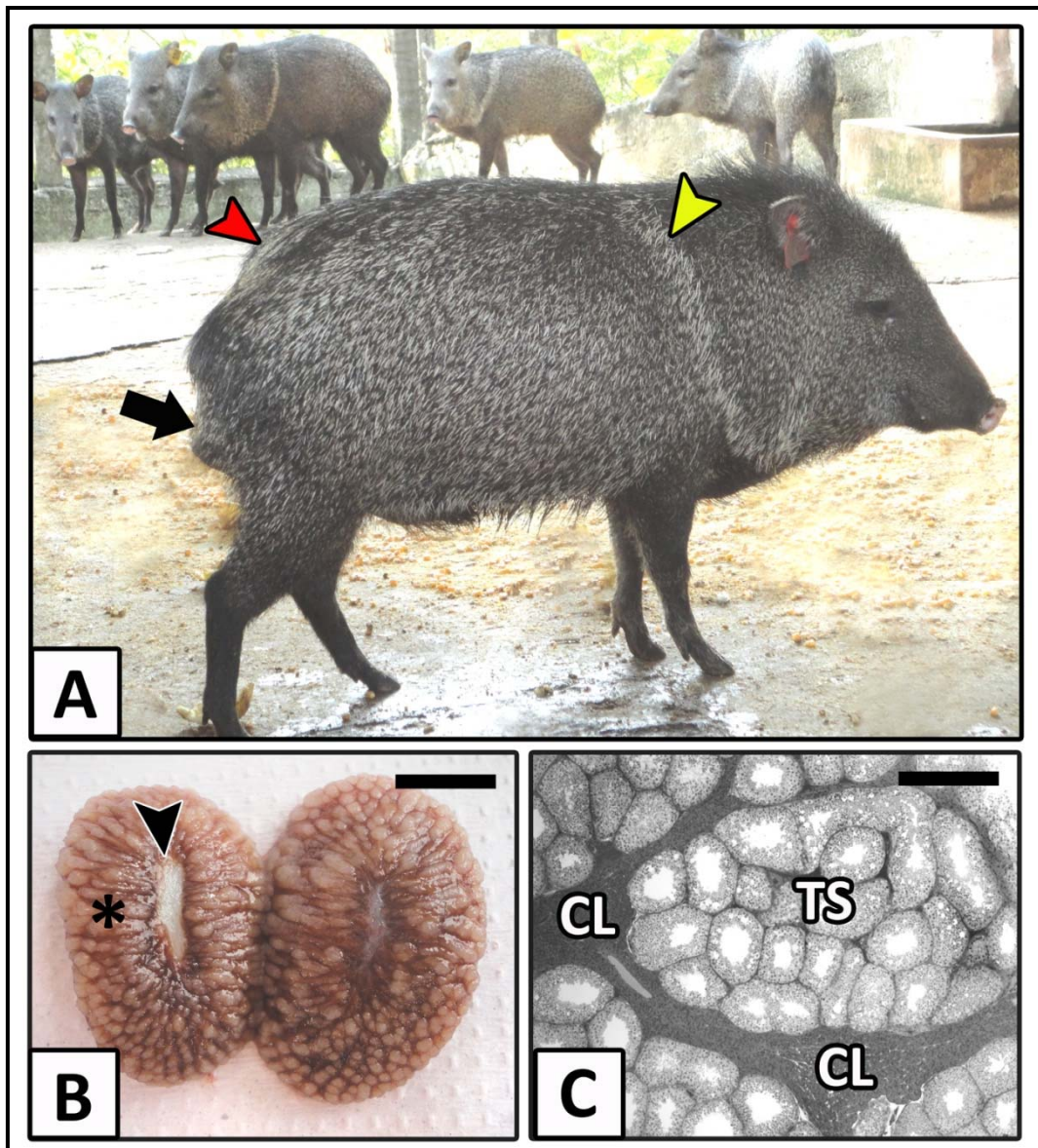
2- Também foi observado que, em comparação com os demais tipos espermatogoniais, as espermatogônias  $A_{und}$  apresentam notável volume nuclear. Peculiaridade esta que nos permitiu identificar de forma mais acurada e segura as espermatogônias  $A_{und}$ . Ainda, estas espermatogônias foram o único tipo espermatogonial a expressarem o  $GFR\alpha-1$  que é o receptor de GDNF.

3- A partir de caracterização morfológica foi observado que as espermatogônias  $A_{und}$  apresentam-se localizadas principalmente nas regiões adjacentes ao compartimento intertubular sem células de Leydig e próximas a vasos sanguíneos. Particularmente, sugerindo que as células de Leydig estão mais relacionadas com a diferenciação espermatogonial ( $A_{al}$  para  $A_1$ ), do que com a manutenção do estado indiferenciado destas células, análises mais acuradas realizadas nas três regiões dos túbulos seminíferos mostraram que as espermatogônias  $A_{und}$  apresentam localização central na região considerada como nicho (T-I).

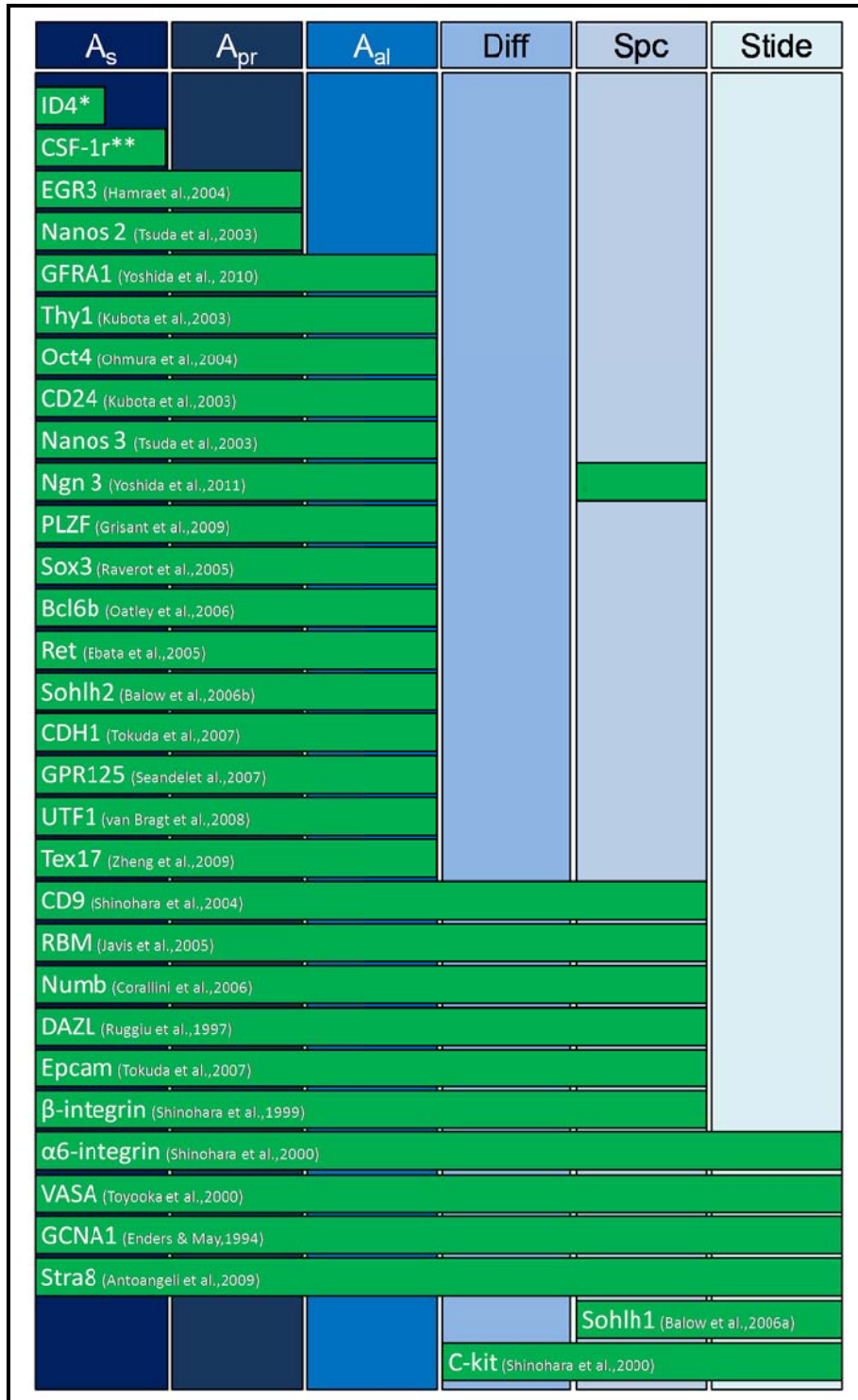
4- Corroborando os resultados obtidos a partir de critérios morfológicos, todas as espermatogônias  $A_{und}$  ( $A_s$ ,  $A_{pr}$  e  $A_{al4-8}$ ) de catetos apresentam expressão de  $GFR\alpha-1$  que foi confirmada por Western blotting. Além disso, foi encontrado que particularmente as  $A_s$  e  $A_{pr}$  localizam-se preferencialmente na região em contato com o compartimento intertubular sem células de Leydig, enquanto a pequena população de espermatogônias  $A_{und}$  encontradas em contato com estas células esteroidogênicas era constituída principalmente de clones espermatogoniais maiores ( $A_{al4}$  e  $A_{al8}$ ). Estes resultados sugerem fortemente a atuação das células de Leydig na diferenciação espermatogonial.

5- Sugerindo que em catetos o CSF-1 também apresenta importante papel no nicho espermatogonial, a expressão do receptor de CSF-1 ( $CSF-1r$ ), também confirmada pelo Western blotting, foi observada em todas as espermatogônias  $GFR\alpha-1$  positivas ( $A_s$ ,  $A_{pr}$ ,  $A_{al4}$ , e  $A_{al8}$ ). Pelo fato do CSF-1 ser produzido pelas células de Leydig e peritubulares mióide, e na região por nós considerada como nicho as células de Leydig serem pouco freqüentes, pode ser inferido que as células peritubulares mióide provavelmente têm participação ativa na regulação do nicho e auto-renovação espermatogonial via  $CSF-1/CSF-1r$ .

# Figuras

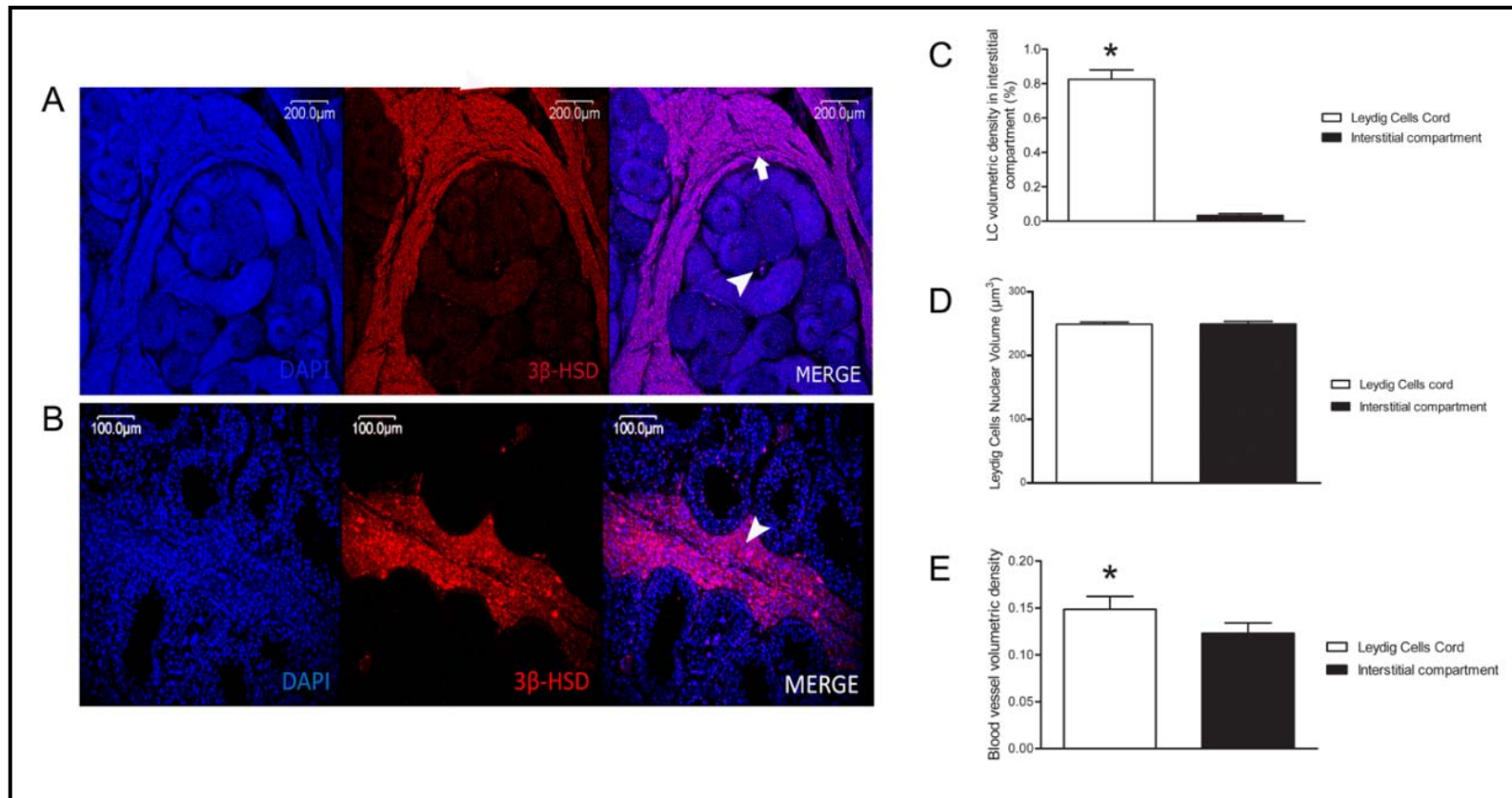


**Figura 1** - (A) Exemplar de cateto (*Tayassu tajacu*) destacando a faixa de pêlos esbraquiçados na região cervical, em forma de collar (cabeça de seta amarela), a glândula de cheiro (cabeça de seta vermelha), também típica desta espécie, e o posicionamento anatômico do escroto (seta preta). (B) Imagem anatômica do testículo de catetos, após corte longitudinal, evidenciando o mediastino (cabeça de seta) e o parênquima testicular (asterisco). (C) Imagem histológica do parênquima testicular de catetos, evidenciando a cito-arquitetura testicular singular desta espécie, onde as células de Leydig (CL) formando cordões celulares delimitam os lóbulos de túbulos seminíferos (TS). Barra em B= 2cm; barra em C= 800  $\mu$ m.

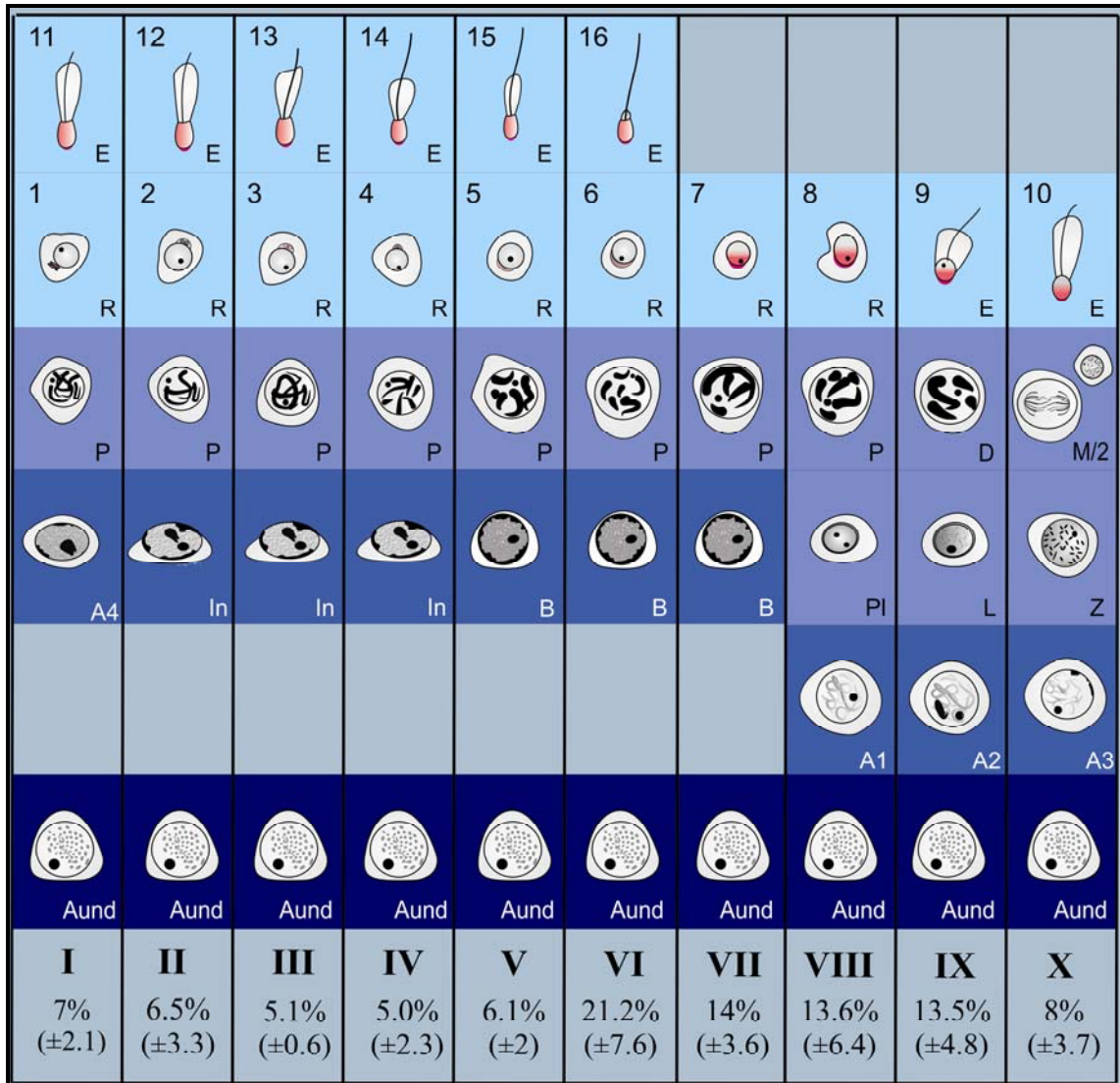


**Figura 2** - Diagrama esquemático ilustrando os marcadores moleculares (barras horizontais em verde), descritos em camundongos para os diferentes tipos de células germinativas, que estão representadas pelas barras verticais em diferentes tonalidades de azul, tais como: espermatogônias do tipo A isolada (A<sub>s</sub>); pareada (A<sub>pr</sub>); alinhada (A<sub>al</sub>); espermatogônias diferenciadas do tipo A, In e do tipo B (Diff); espermatócitos (Spc); espermátides (Stide). \*Oatley *et al.*, 2011; \*\* Oatley *et al.*, 2009.

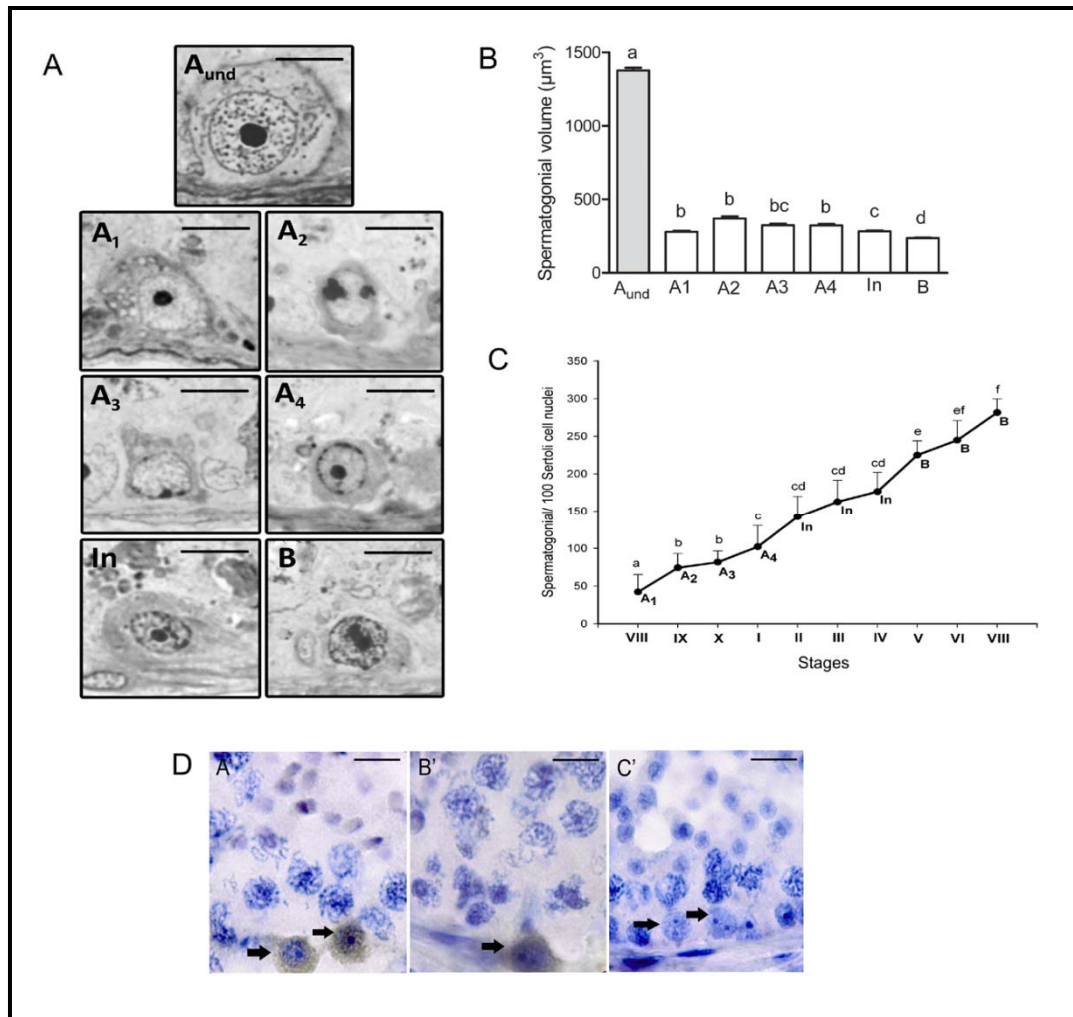




**Figura 3** - Citoarquitetura e volume nuclear das células de Leydig e quantificação do percentual de vascularização do parênquima testicular de catetos. Conforme esperado, a imunolocalização de 3β-HSD foi observada apenas nas células de Leydig (Figs. 1A e B; seta), que em sua grande maioria estavam localizadas ao redor dos túbulos seminíferos (Fig. 1C;  $p < 0,05$ ), formando cordões celulares envolvendo os mesmos. Apesar das células de Leydig estarem presentes em pequeno percentual entre os túbulos seminíferos (Figs. 1B-C, cabeça de seta), o volume nuclear das mesmas não diferiu daquele das células de Leydig formando cordões (Fig. 1D). O percentual de vasos sanguíneos foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nas regiões dos cordões de células de Leydig (Fig. 1E).

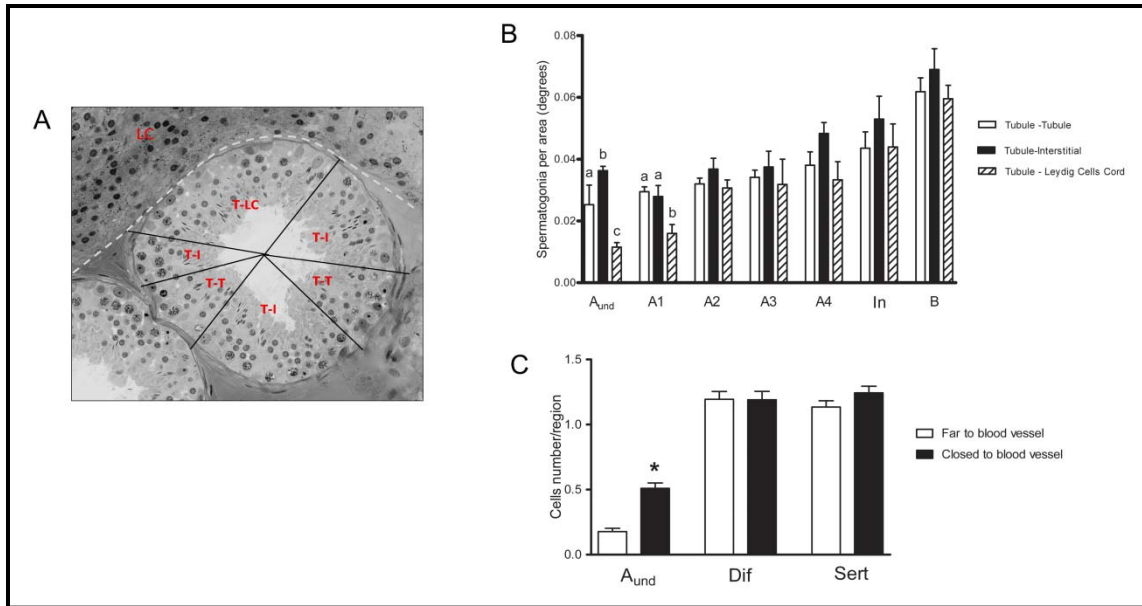


**Figura 4** - Diagrama ilustrando os dez estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES), indicados pelos algarismos romanos, caracterizados em catetos baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico. As freqüências relativas de cada estágio (média±epm) também estão representadas na base da figura. As células germinativas presentes em cada estágio estão representadas pelas seguintes abreviações: A<sub>und</sub> (espermatogônia indiferenciada); A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In e B (espermatogônias diferenciadas dos tipos A, intermediária e do tipo B, respectivamente); PI, pré-leptóteno; L, leptóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno; D, diplóteno; M/2, figura de meiose. Os números arábicos (de 1 a 16) indicam cada passo do desenvolvimento do sistema acrossômico (representado em vermelho) nas espermátides em catetos

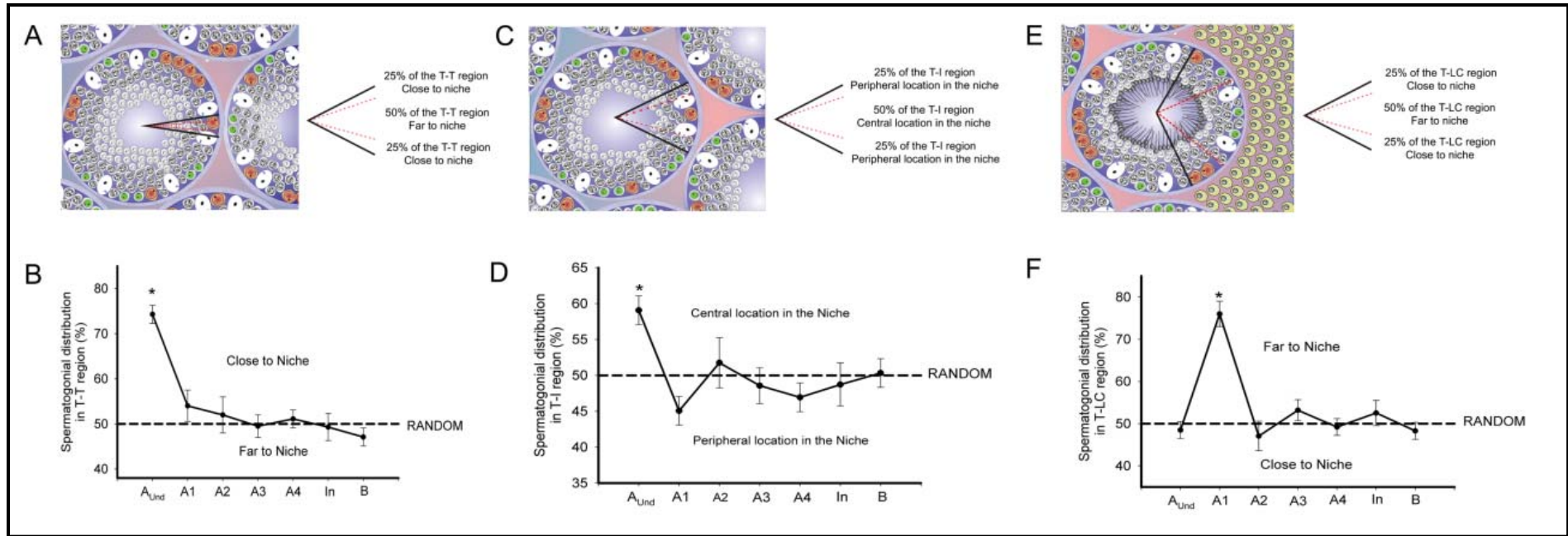


**Figura 5** - Caracterização morfológica, estereológica e fenotípica dos diferentes tipos espermatogoniais encontrados em catetos. (A) Micrografia de alta resolução realçando os detalhes nucleares que permitem a identificação dos diferentes tipos espermatogoniais caracterizados: A<sub>und</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In e B. (B) Micrografia indicando que o único tipo celular GFRa-1<sup>+</sup> no epitélio seminífero foi a A<sub>und</sub> (setas em B' e B''). B''' = controle negativo. (C) Volume nuclear dos diferentes tipos espermatogoniais, onde se observa que, em comparação com as demais espermatogônias, a A<sub>und</sub> apresenta o maior volume (p<0,05), enquanto a espermatogônia do tipo B apresentou o menor volume (p<0,05). (D) Número de espermatogônias indiferenciadas (A<sub>und</sub>; círculo branco) e diferenciadas (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In e B; círculo preto) por 1000 núcleos de células de Sertoli, nos dez estádios do ciclo do epitélio seminífero, indicando a cinética de proliferação espermatogonial. Figura A, barra = 5 µm; Figura D, barra = 8 µm.

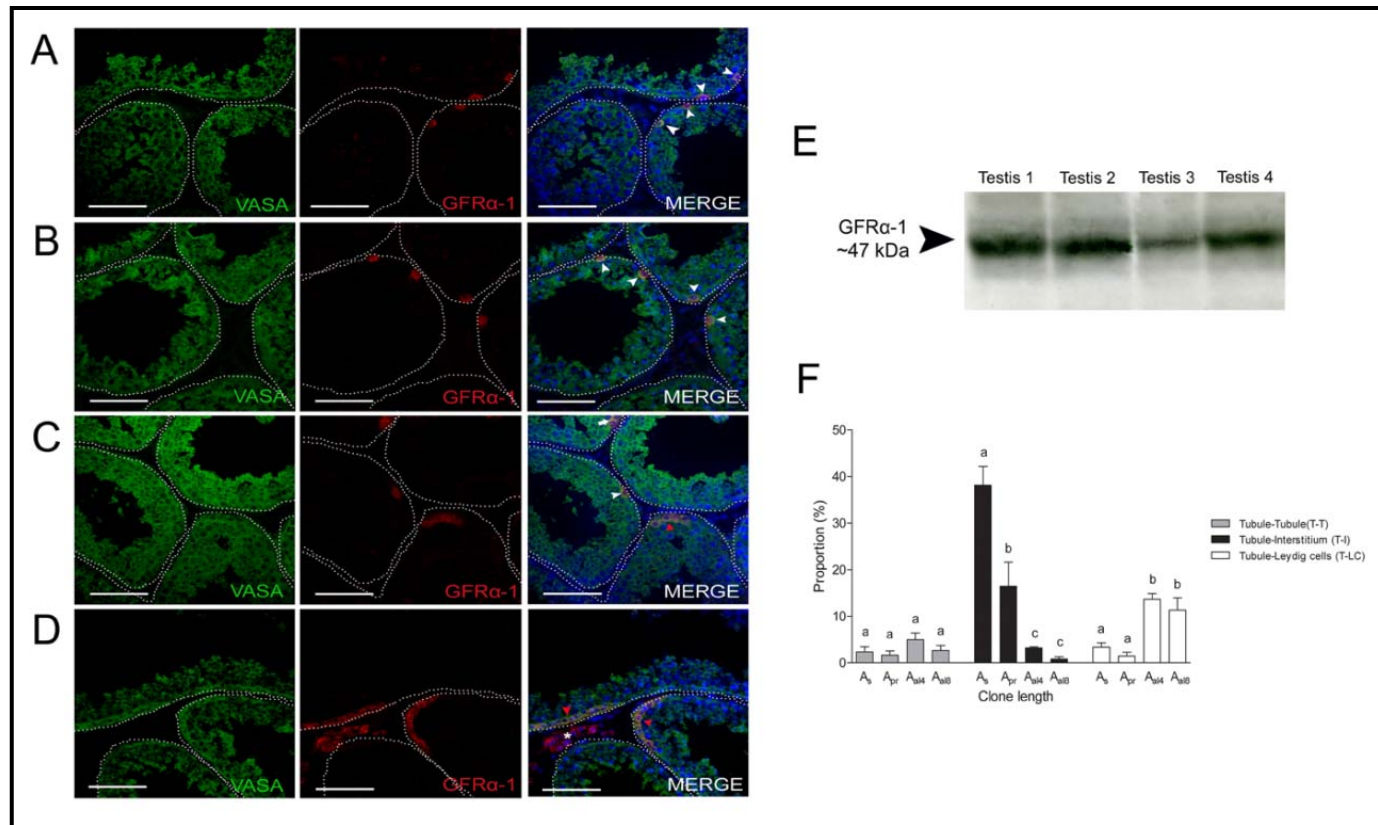




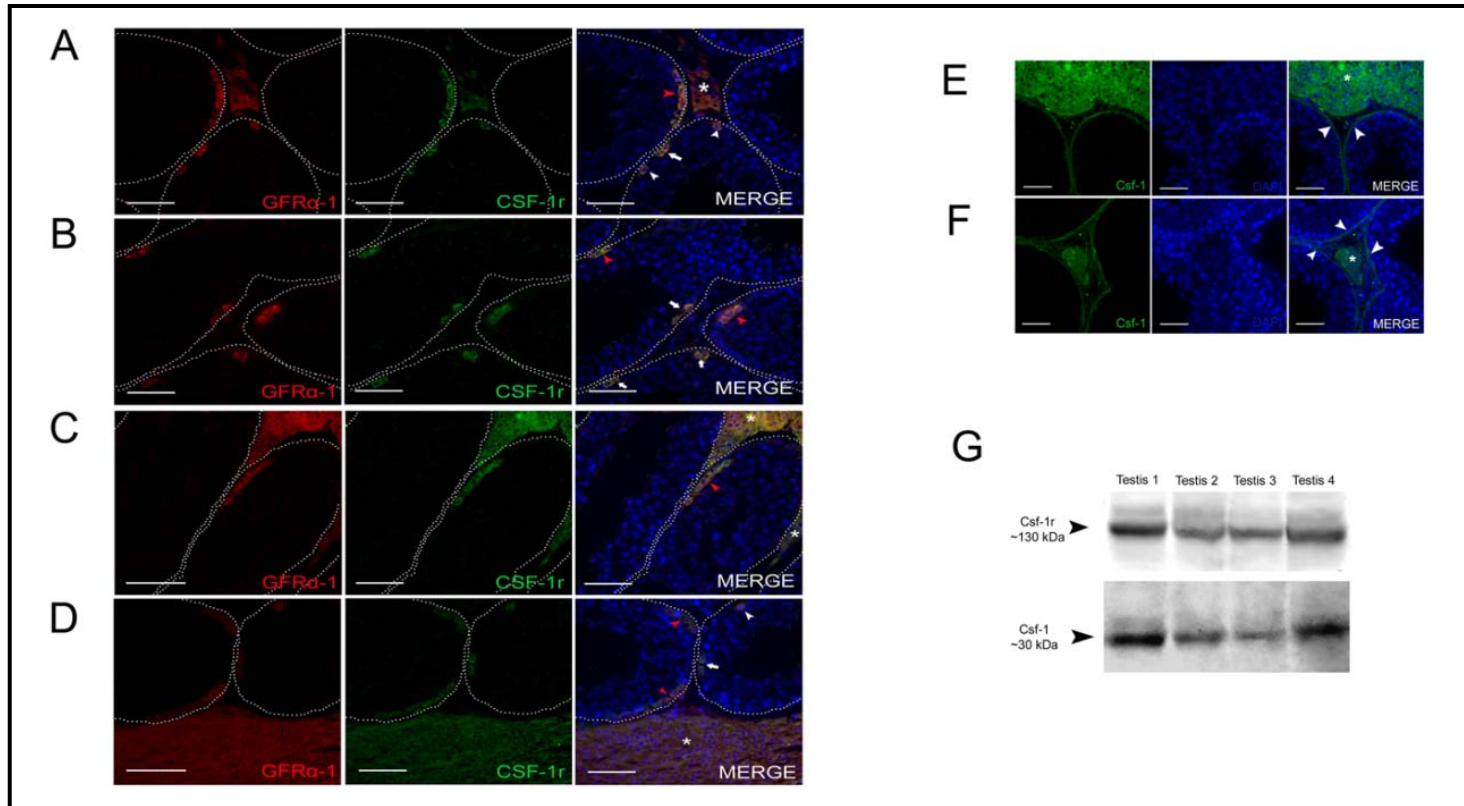
**Figura 6** - (A) Distribuição espermatogonial ao longo do perímetro das secções transversais de túbulos seminíferos, baseada nas três regiões previamente estabelecidas: Túbulo-Túbulo (T-T), Túbulo-Interstício (T-I) e Túbulo-células de Leydig (T-LC). (B) Conforme pode ser observado, espermatogônias A<sub>und</sub> encontravam-se preferencialmente localizadas ( $p < 0,05$ ) na região T-I (considerada como nicho) e tendência semelhante foi observada para o tipo A<sub>1</sub>. Os demais tipos espermatogoniais encontravam-se aleatoriamente localizados nas secções transversais de túbulos seminíferos. (C) Considerando-se apenas a região T-I, foi observado que A<sub>und</sub> localizava-se preferencialmente próximo aos vasos sanguíneos ( $p < 0,05$ ); tendência esta não observada para as espermatogônias diferenciadas (A<sub>1</sub> to B) e mesmo células de Sertoli (SCNu).



**Figura 7** - Distribuição espermatogonial nas três diferentes regiões previamente estabelecidas: (A) Túbulo-túbulo (T-T), (C) Túbulo-interstício (T-I) e (E) Túbulo-células de Leydig (T-LC). Com o objetivo de realizar uma avaliação mais precisa da distribuição espermatogonial, essas três regiões foram subdivididas em área periférica (delimitada externamente pelas linhas pretas) e central (delimitado por linhas vermelhas pontilhadas). As Figuras 5B, D e F indicam as freqüências espermatogoniais em relação as áreas periférica (T-T) e central (T-I e T-LC). (B) Na região T-T, poucas A<sub>Und</sub> (p<0,05) estão presentes, sendo que esta população apresentou-se principalmente localizada na área periférica (p<0,05). (D) No entanto, na região T-I onde houve localização preferencial de A<sub>Und</sub>, este tipo celular apresentou-se principalmente concentrado na área central (p<0,05). (F) Já na região T-LC, as espermatogônias do tipo A<sub>1</sub> encontravam-se principalmente na área central (p<0,05), enquanto os demais tipos espermatogoniais apresentaram-se aleatoriamente distribuídos (p > 0,05).

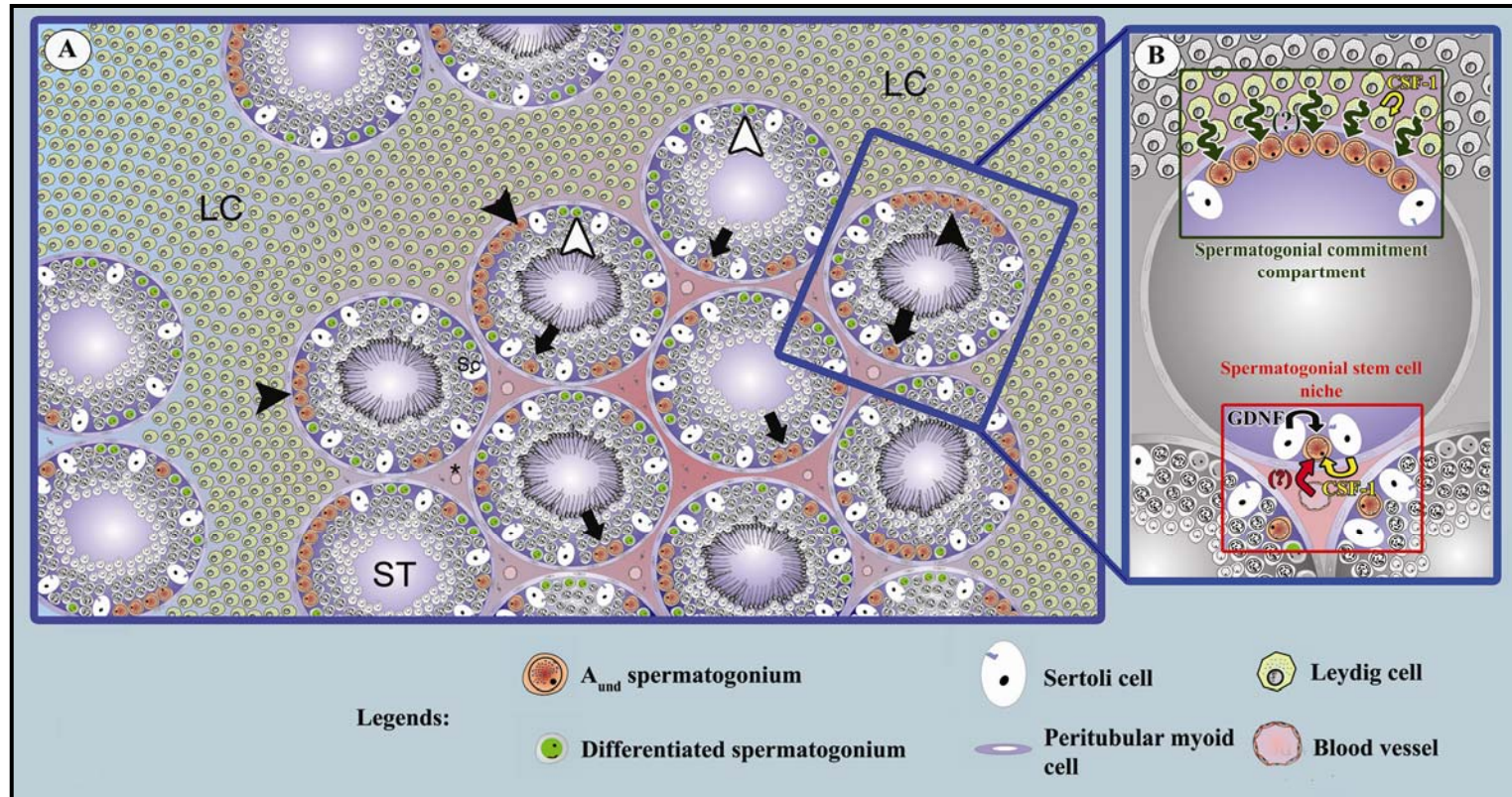


**Figura 8** - Imunolocalização e distribuição das espermatogônias indiferenciadas ( $A_{und}$ ) ao longo da base do epitélio seminífero. Conforme indicado, o receptor  $GFR\alpha-1$  foi observado nas  $A_{und}$ , sendo expresso em  $A_5$  (A, B e C; cabeça de seta),  $A_{pr}$  (C; seta) e  $A_{al4-8}$  (D; cabeça de seta vermelha). Conforme ilustrado na Figura D as células de Leydig (asterisco) também apresentaram expressão de  $GFR\alpha-1$ . (E) Através de western blot, verificou-se a expressão de  $GFR\alpha-1$  no parênquima testicular de catetos (n=4). (F) A avaliação da distribuição dos clones espermatogoniais  $GFR\alpha-1^+$  mostrou que estas células apresentaram localização preferencial pela região em contato com o compartimento intertubular sem células de Leydig (T-I,  $p < 0,05$ ). De maneira interessante, dentre as células  $GFR\alpha-1^+$  observadas na região em contato com as células de Leydig (T-LC), encontravam-se predominantemente os clones de espermatogônias  $A_{al4}$  e  $A_{al8}$  (cabeça de seta em D e F), sugerindo um possível papel das células de Leydig na diferenciação destas células. Barras = 50  $\mu$ m.



**Figura 9** - Imunomarcção para CSF-1/CSF-1r no parênquima testicular de catetos. Conforme pode ser notado, a expressão de CSF-1r foi observada em co-localização com as células GFR $\alpha$ -1+, incluindo-se A<sub>s</sub> (A e D; cabeça de seta branca), A<sub>pr</sub> (A, B e D; seta branca) e A<sub>al4-8</sub> (A-D; cabeça de seta vermelha). As células de Leydig também apresentaram expressão de CSF-1r (A, C e D; asterisco). A avaliação de imunolocalização de CSF-1 (proteína/fator) mostrou a expressão do mesmo nas células de Leydig (E e F; asterisco) e peritubulares mióides (E e F; cabeça de seta), indicando que no testículo de cateto esta proteína/fator é produzido por estas células. (G) Corroborando estes resultados, a expressão das proteínas CSF-1 e CSF-1r também foi observada através de western blot. Barras = 50  $\mu$ m.





**Figura 10** - Esta figura esquemática ilustra os principais resultados obtidos no presente estudo. Assim, a partir da cito-arquitetura das células de Leydig (LC), três diferentes regiões dos túbulos seminíferos (ST) puderam ser caracterizadas (T-T, T-I e T-LC). Desta forma, foi observado que a  $A_{und}$  apresentou localização preferencial pela região em contato com o interstício sem células de Leydig (T-I; seta preta), sugerindo que provavelmente o nicho de espermatogônias tronco em catetos não depende da ação direta das células de Leydig. As análises de distribuição de clones espermatogoniais  $GFR\alpha-1^+$  permitiram evidenciar que os clones de  $A_{al4-8}$  localizavam-se preferencialmente na região em contato com as células de Leydig (cabeça de seta preta), (B) possibilitando inferir que as células de Leydig podem desempenhar importante papel no comprometimento destas células com a diferenciação, e também indicando que as células peritubulares mióide apresentam um importante papel na manutenção do nicho espermatogonial através da expressão de CSF-1.

# Referências

## 8. Referências

- ALMEIDA FF, LEAL MC, FRANÇA LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod.* V.75, p.792-799, 2006.
- AMANN, RP. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.* v.2, p.37-58, 1981.
- ANTONANGELI F, GIAMPIETRI C, PETRUNGARO S, FILIPPINI A, ZIPARO E. Expression profile of a 400-bp Stra8 promoter region during spermatogenesis. *Microsc. Res. Tech.* v.72, p.816-822, 2009.
- BALLOW D, MEISTRICH ML, MATZUK M, RAJKOVIC A. Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev Biol.* v.294, p.161-167, 2006a.
- BALLOW DJ, XIN Y, CHOI Y, PANGAS SA, RAJKOVIC A. Sohlh2 is a germ cell-specific bHLH transcription factor. *Gene Expr. Patterns.* v.6, p.1014-1018, 2006b.
- BARDIN CW. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). *The Leydig cell*. Viena: Cache River Press. p.31-42 1996.
- BASCOM, KF; OSTRUD, HL. Quantitative studies of testicle. II Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anat. Rec.* 31:159-169. 1925.
- BENDEL-STENZEL M, ANDERSON R, HEASMAN J, WYLIE C. The origin and migration of primordial cells in the mouse. *Sem Cell & Develop Biol;* v. 9, p.393-400, 1998.
- BUAAS FW, KIRSH AL, SHARMA M, MCLEAN DJ, MORRIS JL, GRISWOLD MD, DE ROOIJ DG, BRAUN RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Gene.*, v.36, p.647, 2004.
- CAIRES K, BROADY J, MCLEAN D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol.* v.205(2) p.133-45, 2010.
- CHIARINI-GARCIA H, ALVES-FREITAS D, BARBOSA IS, ALMEIDA FR. Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Anim Reprod Sci.*, v.116(1-2), p.139-54, 2009.

- CHIARINI-GARCIA H, HORNICK JR, GRISWOLD MD, RUSSELL LD. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod.* v.65(4), p.1179-85, 2001.
- CHIARINI-GARCIA H, RAYMER AM, RUSSELL LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, v.126(5), p.669-80, 2003.
- CHIARINI-GARCIA H, RUSSELL LD. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod.* V. 65, p.1170–1178 2001
- CORALLINI S, FERA S, GRISANTI L, FALCIATORI I, MUCIACCIA B, STEFANINI M, VICINI E. Expression of the adaptor protein m-Numb in mouse male germ cells. *Reproduction*, v.132, p.887-897, 2006.
- COSTA GMJ, CAMPOS-JUNIOR PHA, LACERDA SMSN, REZENDE-NETO JV, GUIMARÃES DA, FRANÇA LR. Comparative testis structure and spermatogenic efficiency in three sui-forms species: the domestic pig (*Sus domesticus*), the wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Suiform Soundings*. v.10(2), p.23-31, 2011.
- COSTA GMJ, LEAL MC, SILVA JV, FERREIRA AC, GUIMARÃES DA, FRANÇA LR. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*), *J. Androl.* v.31(2) p.221-30, 2010.
- COSTA GMJ. Estudo comparativo da função testicular e eficiência espermatogênica em três diferentes espécies de mamíferos silvestres com potencial interesse econômico. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2009, 110 p.
- COSTOYA JA, HOBBS RM, BARNA M, CATTORETTI G, MANOVA K, SUKHWANI M, ORWIG KE, WOLGEMUTH DJ, PANDOLFI PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* v.36, p.653, 2004.
- DAVIDOFF MS, MIDDENDORFF R, KOEVA Y, PUSCH W, JEZEK D, MULLER D. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors GFRa-1 in the human testis. *Ital. J. Anat. Embryol.* v.106(Suppl2), p.1327-32, 2004.



DE GENDT K, SWINNEN JV, SAUNDERS PT, SCHOONJANS L, DEWERCHIN M, DEVOS A, TAN K, ATANASSOVA N, CLAESSENS F, LÉCUREUIL C, HEYNS W, CARMELIET P, GUILLOU F, SHARPE RM, VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci*, v. 101, p.1327-32, 2004.

DE ROOIJ DG & GROOTEGOED JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* v.10(6) p.694-701, 1998.

DE ROOIJ DG & RUSSELL LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, v.21, p.776-98, 2000.

DE ROOIJ DG & VAN PELT AMM. Spermatogonial stem cell biology. *Annu Rev Biomed Sci*; v.5 p.105-114, 2003.

DE ROOIJ DG. Spermatogonial stem cell biology. I. Normal situation. *Cell and Tissue kinetics*. v.6, p.281-287, 1973.

DEFALCO T & CAPEL B. Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol*. v.25, p.457-482, 2009.

DO NASCIMENTO HF, DRUMOND AL, DE FRANÇA LR, CHIARINI-GARCIA H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int J Androl*. v.32(5), p.486-97, 2009.

DOBRINSKI I, OGAWA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Effect of the GnRH-agonist leuprolide on colonization of recipient testes by donor spermatogonial stem cells after transplantation in mice. *Tissue cell*. v.33, p.200-207, 2001.

DYM M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.91, p.11298-11302, 1994.

EBATA KT, ZHANG X, NAGANO MC. Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol Reprod Dev*. 2005 Oct;72(2):171-81.

ENDERS GC, MAY JJ Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol*. 1994 Jun;163(2):331-40.

FAN X & ROBAIRE B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*. v.139, p.2128-2136, 1998.

FAWCETT DW, NEAVES WB, FLORES MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*, v.9(5), p.500-532, 1973.

FRANÇA LR & RUSSELL LD. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J; GARCIA, M (Ed.). Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219. 1998.

FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v.63,p.300-318, 2005.

FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 2005 Jan 15;63(2):300-18.

FRANÇA, LR; HESS, RA; COOKE, PS; RUSSELL, LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec*. 242:57-69. 1995.

GARCIA AR, KAHWAGE PR, OHASHI OM. Aspectos reprodutivos de caítilus (*Tayassu tajacu*) *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, n.2, p.71-81, 2009.

GASSEI K, EHMCKE J, DHIR R, SCHLATT S. Magnetic activated cell sorting allows isolation of spermatogonia from adult primate testes and reveals distinct GFR $\alpha$ 1-positive subpopulations in men. *J Med Primatol*. 2010 Apr;39(2):83-91. Epub 2009 Dec 15.

GASSEI K, EHMCKE J, SCHLATT S. Efficient enrichment of undifferentiated GFR $\alpha$ 1+ spermatogonia from immature rat testis by magnetic activated cell sorting. *Cell Tissue Res*. 2009 Jul;337(1):177-83. Epub 2009 May 12.

GOYAL SR, TALIB VH, KHURANA SK. An overview of PSA/free PSA with special reference to recent trends in diagnosis of prostatic cancer. *Indian J Pathol Microbiol*. v.42, p.171-178, 1999.

GRISANTI L, FALCIATORI I, GRASSO M, DOVERE L, FERA S, MUCIACCIA B, FUSO A, BERNO V, BOITANI C, STEFANINI M, VICINI E. Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation. *Stem Cells*. 2009 Dec;27(12):3043-52.

HAEGEBARTH A & CLEVERS H. Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Am J Pathol*. v.174(3), p.715-21, 2009.

HAMRA FK, SCHULTZ N, CHAPMAN KM, GRELLHESL DM, CRONKHITE JT, HAMMER RE, GARBERS DL. Defining the spermatogonial stem cell. *Dev Biol*. 2004 May 15;269(2):393-410.

HESS RA & FRANCA LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: CHENG, CY (Ed). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. N.Y.: Landes Bioscience. 2007.

HOFMANN MC, BRAYDICH-STOLLE L, DYM M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev. Biol.* v.279, p.114, 2005.

HOFMANN MC. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol*, v.288, p.95-103, 2008.

JARVIS S, ELLIOTT DJ, MORGAN D, WINSTON R, READHEAD C. Molecular markers for the assessment of postnatal male germ cell development in the mouse. *Hum Reprod*. 2005 Jan;20(1):108-16. Epub 2004 Nov 11.

JOHNSTON DS, OLIVAS E, DI CANDELORO P, WRIGHT WW. Stage-Specific Changes in GDNF Expression by Rat Sertoli Cells: A Possible Regulator of the Replication and Differentiation of Stem Spermatogonia. *BiolReprod*, published 8 June, PMID: 110.087676. 2011.

JOHNSTON DS, OLIVAS E, DI CANDELORO P, WRIGHT WW. Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol Reprod*. 2011 Oct;85(4):763-9. Epub 2011 Jun 8.

JOHNSTON DS, RUSSELL LD, FRIEL PJ & GRISWOLD MD Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology* v.142, p.2405-2408, 2001.

KLEIN AM, NAKAGAWA T, ICHIKAWA R, YOSHIDA S, SIMONS BD. Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover. *Cell Stem Cell*, v.7(2), p.214-24, 2010.

KOKKINAKI M, LEE TL, HE Z, JIANG J, GOLESTANEH N, HOFMANN MC, CHAN WY, DYM M. The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod*, p.80(4), p.707-17, 2009.

KOPERA IA, BILINSKA B, CHENG CY, MRU DD. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* v.27, p.1593-605, 2010.

KUBOTA H, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristic with other stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*. v.100, p.6487-6492, 2003.

LEE J, KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, OGONUKI N, MIKI H, TOYOKUNI S, KIMURA T, NAKANO T, OGURA A & SHINOHARA T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* v.134, p.1853-1859, 2007.

LI L & CLEVERS H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. v.327(5965), p.542-5, 2010.

LOBO FS. *Mamíferos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Artes Gráficas Gomes de Sousa, 1962.

MCGUINNESS MP & ORTH JM. Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in the testes of newborn rats *in vivo* e *in vitro*. *Anat Rec*, v.233(4), p.527- 537, 1992.

MIDZAK AS, CHEN H, PAPADOPOULOS V, ZIRKIN BR. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. *Mol Cell Endocrino*, v.299(1), p.23-31 2009.

NAKAGAWA T, SHARMA M, NABESHIMA Y, BRAUN RE, YOSHIDA S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science*. v.328(5974), p.62-7, 2010.

NÓBREGA RH, GREEBE CD, VAN DE KANT H, BOGERD J, DE FRANÇA LR, SCHULZ RW. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One*. Sep 20;5(9). pii: e12808. 2010.

OATLEY JM, AVARBOCK MR, TELARANTA AI, FEARON DT & BRINSTER RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.103, p.9524-9529, 2006.

OATLEY JM, OATLEY MJ, AVARBOCK MR, TOBIAS JW, BRINSTER RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*. v.136(7), p.1191-9, 2009.

OATLEY MJ, KAUCHER AV, RACICOT KE, OATLEY JM. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and

regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol Reprod.* v.85(2), p.347-356, 2011.

OATLEY MJ, RACICOT KE, OATLEY JM. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biol Reprod.* v.84(4), p.639-45, 2011.

OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Leuprolide, a gonadotropin releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. *Tissue Cell.* v.30(5), p.583-8, 1998.

OHMURA M, YOSHIDA S, IDE Y, NAGAMATSU G, SUDA T, OHBO K. Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Arch Histol Cytol.* 2004 Nov;67(4):285-96.

ORWIG KE, RYU BY, AVARBOCK MR, BRINSTER R. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* v.99, p.11706-11711, 2002.

PAŁASZ A & KAMIŃSKI M. Stem cell niche in the Drosophila ovary and testis; a valuable model of the intercellular signalling relationships. *Adv Med Sci.* v.54(2), p.143-9, 2009.

PELLINIEMI LJ, KUOPIO T, FROJDMAN K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD (Eds). *The Leydig Cell.* Ed. Cache River Press. Vienna. p.143-157, 1996.

PHILLIPS BT, GASSEI K, ORWIG KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B BiolSci,* v.365(1546), p.1663-78, 2010.

RAVEROT G, WEISS J, PARK SY, HURLEY L, JAMESON JL. Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol.* 2005 Jul 1;283(1):215-25.

REDING SC, STEP NOSKI AL, CLONINGER EW, OATLEY JM. THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction.* v.139(5), p.893-903, 2010.

ROOSEN-RUNGE, EC. *The process of spermatogenesis in animals.* Cambridge: University Press. 1977.

ROSS AJ & CAPEL B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Tren Endocrinol Metab.* v.16, p.19-25, 2005.

RUGGIU M, SPEED R, TAGGART M, MCKAY SJ, KILANOWSKI F, SAUNDERS P, DORIN J, COOKE HJ. The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature*. 1997 Sep 4;389(6646):73-7.

RUSSEL LD & GRISWOLD MD. The Sertoli cell. (1 ed). 1993.

RUSSELL LD, CHIARINI-GARCIA H, KORSMEYER SJ, KNUDSON CM. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod*. v.66(4), p.950-8, 2002.

RUSSELL, L.D; CORBIN, TJ; BORG, KE; *et al*. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology*. 133:2062-2070. 1993.

RUSSELL, L.D; SINHA-HIKIM, AP; GHOSH, S. *et al*. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A (Ed). Function of somatic cells in the testis. New York: Springer-Verlag. 1994.

RUSSELL, LD. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, AH; HARDY, MP; RUSSELL, LD (Eds.). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press. 43-96. 1996.

RUSSELL, LD; ETTLIN, RA; SINHA-HIKIM, AP; CLEGG, ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 1990.

RYU BY, ORWIG KE, OATLEY JM, AVARBOCK MR, BRINSTER RL Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* v.24, p.1505-1511, 2006.

SADATE-NGATCHOU PI, POUCHNIK DJ, GRISWOLD MD. Identification of testosterone-regulated genes in testes of hypogonadal mice using oligonucleotide microarray. *Molecular of Endocrinology* v.18, p.422-433, 2004.

SCHRANS-STASSEN BH, VAN DE KANT HJ, DE ROOIJ DG, VAN PELT AM. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology* v.140, p.5894, 1999.

- SETCHELL BP & BREED WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: NEILL, JD (Ed), *Physiology of Reproduction*. Elsevier. p.771-825. 2006.
- SHARPE RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E; NEIL, JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. p.1363-1434. 1994.
- SHARPE, RM; MCKINNELL, C; KIVLIN, C; FISHER, JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 125:769-84. 2003.
- SHENG XR, BRAWLEY CM, MATUNIS EL. Dedifferentiating spermatogonia outcompete somatic stem cells for niche occupancy in the Drosophila testis. *Cell Stem Cell*. v.5(2), p.191-203, 2009.
- SHETTY G, WILSON G, HUHTANIEMI I, BOETTGER-TONG H, MEISTRICH ML. Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. *Endocrinology*, v.142, p.2789–2795, 2001.
- SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5504-9.
- SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 18;97(15):8346-51.
- SHUPNIK MA & SCHREIHOFFER DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl*. v.18, p.341-344, 1997.
- SILVA AF, TEÓFILO TS, CALADO EB, FONTENELE-NETO JD. Influência da testosterona na histofisiologia da glândula de cheiro do (*Tayassu tajacu*). In: Reunião Anual da SBPC, 57, 2005, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência, 2005.
- SUÁREZ-QUIAN CA, MARTÍNEZ-GARCÍA F, NISTAL M, REGADERA J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*. v.84, p.350-358. 1999.



- TEGELENBOSCH RA, DE ROOIJ DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res.v.* 290(2), p.193-200, 1993.
- TOKUDA M, KADOKAWA Y, KURAHASHI H, MARUNOUCHI T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod.* 2007 Jan;76(1):130-41. Epub 2006 Oct 11.
- TOYOOKA Y, TSUNEKAWA N, TAKAHASHI Y, MATSUI Y, SATOH M, NOCE T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev.* 2000 May;93(1-2):139-49.
- TSUDA M, SASAOKA Y, KISO M, ABE K, HARAGUCHI S, KOBAYASHI S, SAGA Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science.* 2003 Aug 29;301(5637):1239-41.
- VAN BRAGT MP, ROEPERS-GAJADIEN HL, KORVER CM, BOGERD J, OKUDA A, EGGEN BJ, DE ROOIJ DG, VAN PELT AM. Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis. *Reproduction.* 2008 Jul;136(1):33-40. Epub 2008 Apr 4.
- VOOG J & JONES DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell.* v.6(2), p.103-115, 2010.
- WALKER WH & CHENG J FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* p.130, p.15-28, 2005.
- WELSH, M; SAUNDERS, PT; ATANASSOVA, N; SHARPE, RM; SMITH, LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 2009.
- WING, TY; CHRISTENSEN, AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat.* 165:13-25, 1982.
- YANG L & PENG R. Unveiling Hair Follicle Stem Cells. *Stem Cell Rev.* In Press 2010.
- YOSHIDA S, M SUKENO, NAKAGAWA T, OHBO K, NAGAMATSU G, SUDA T, YOSHIDA S, SUKENO M, NABESHIMA Y A. Vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, v.317, p.1722-1726, 2007.
- YOSHIDA S, TAKAKURA A, OHBO K, ABE K, WAKABAYASHI J, YAMAMOTO M, SUDA T, NABESHIMA Y. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev. Biol.* v.269, p.447, 2004.



## Referências

---

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*, v.211(1), p.149-58, 2007.

ZHENG K, WU X, KAESTNER KH, WANG PJ. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol*. 2009 Jun 29;9:38.

ZIRKIN BR, AWONIYI C, GRISWOLD MD, RUSSELL LD, SHARPE R. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl*. v.15, p.273-6, 1994.

# **Anexos**