

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

**MARCADORES MOLECULARES, NICHOS E  
CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO  
ESPERMATOGONIAIS EM EQUÍDEOS**

**DOUTORANDO: GUILHERME MATTOS JARDIM COSTA**

**ORIENTADOR: LUIZ RENATO DE FRANÇA**

**Belo Horizonte**

**2012**

**GUILHERME MATTOS JARDIM COSTA**

**MARCADORES MOLECULARES, NICHOS E  
CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO  
ESPERMATOGONIAIS EM EQUÍDEOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Luiz Renato de França

**Belo Horizonte**

**2012**

Dedico este trabalho aos integrantes do  
Laboratório de Biologia Celular/ICB-UFMG  
que contribuíram, em muito, com o  
desenvolvimento deste estudo.

## **AGRADEÇO**

**Ao Professor Dr. Luiz Renato de França, pela competente orientação no presente estudo e pelos valiosos ensinamentos ao longo dos nove anos de convivência trabalhando no Laboratório de Biologia Celular.**

**À Professora Dra. Gleide Fernandes de Avelar, pela grande contribuição e ativa participação em todos os experimentos referente aos estudos envolvendo equídeos.**

**À Professora Dra. Tânia Mara Segatelli, pela amizade e auxílios na execução dos estudos.**

**À Pós-doutoranda Dra. Samyra MSN Lacerda, pelo carinho, ajuda incondicional no desenvolvimento destes estudos, uma excelente companheira de trabalho.**

**Ao doutorando Paulo Henrique A Campos-Júnior, pela ajuda constante durante o desenvolvimento deste projeto.**

**Ao graduando José Vilela Rezende-Neto, pela participação efetiva na obtenção de resultados e também pela grande dedicação na realização dos experimentos.**

**Aos veterinários Felipe Martins e Bruno Andrade, pela valiosa contribuição durante a realização de diversos procedimentos cirúrgicos.**

**Ao Professor Dr. Antônio Carlos S Castro, pelo apoio constante e pelas longas discussões sobre anatomia veterinária que tanto me influenciou e auxiliou na decisão de lecionar nesta disciplina.**

**Ao Professor Emérito José Carlos Nogueira, o “sucuri da lâmina”, grande incentivador do meu crescimento pessoal e profissional.**

**À técnica do laboratório Mara Livia dos Santos e aos amigos do Laboratório de Biologia Celular, que tiveram participação direta e indireta na execução deste estudo.**

**À equipe da Fazenda Experimental de Pedro Leopoldo, em especial ao Professor Dr. Luiz Lago e ao Pitágoras.**

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

**Aos amigos da Pós-graduação, em especial ao Héder, Bruno, Herman, Chico, Amanda e Marcão.**

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

**À minha família, pelo apoio e participação ativa durante meu doutoramento.**

**Esta tese 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 financeiro das seguintes instituições:**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

**Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CES** = Ciclo do Epitélio Seminífero.

**A<sub>und</sub>** = Espermatogônia do tipo A indiferenciada.

**A<sub>s</sub>** = Espermatogônia isolada.

**A<sub>pr</sub>** = Espermatogônia pareada.

**A<sub>al</sub>** = Espermatogônia alinhada.

**A<sub>1</sub>** = Espermatogônia diferenciada do tipo A<sub>1</sub>.

**A<sub>2</sub>** = Espermatogônia diferenciada do tipo A<sub>2</sub>.

**A<sub>3</sub>** = Espermatogônia diferenciada do tipo A<sub>3</sub>.

**B<sub>1</sub>** = Espermatogônia diferenciada do tipo B<sub>1</sub>.

**B<sub>2</sub>** = Espermatogônia diferenciada do tipo B<sub>2</sub>.

**GDNF** = Glial cell line Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado das células da Glia).

**GFRA1** = GDNF Family Receptor Alpha 1 (Receptor Alfa 1 da Família do GDNF).

**PLZF** = Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger (proteína Zinc Finger da Leucemia Promielocítica).

**CSF1** = Colony-stimulating factor 1 (Fator Estimulante de Colônia 1).

**CSF1R** = CSF1 receptor (Receptor do CSF1).

**Caspase-3** = cysteine-aspartic-acid-proteases-3 (enzima com um resíduo de cisteína capaz de clivar proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico durante o processo apoptótico).

**TT** = Regiões das secções transversais de túbulos seminíferos adjacentes a outros túbulos seminíferos.

**TI + VS** = Regiões das secções transversais de túbulos seminíferos próximos ao compartimento intersticial contendo vasos sanguíneos.

**TI – VS** = Regiões das secções transversais de túbulos seminíferos adjacentes ao compartimento intersticial sem vasos sanguíneos.

**TIC** = Regiões das secções transversais de túbulos seminíferos próximos ao compartimento intersticial contendo tecido conjuntivo.

**Anexina V** = Proteína que se liga a fosfatidilserina externalizada na membrana celular nas fases iniciais da apoptose.

**PI** = propidium iodide (iodeto de propídeo). O iodeto de propídeo se liga às cadeias do DNA, porém não consegue atravessar uma membrana citoplasmática de uma célula viável. Dessa forma, marca seletivamente células mortas.

**DMSO** = Dimetilsulfóxido.

**DMEM** = Dulbecco Modified Eagle Médium (Meio Dulbecco Modificado por Eagle).

**FBS** = Fetal Bovine Serum (Soro Fetal Bovino).

**HBSS** = Hank's buffered salt solution (Solução salina tamponada de Hanks).

**MTT** = Methyl Thiazole Tetrazolium (Metil Tiazolil de Tetrazólio).

**VASA** = marcador específico de células germinativas.

**DAB** = Diaminobenzidina

**SSC** = Célula-tronco espermatogonial (*Spermatogonial Stem Cell*)

## RESUMO

As células-tronco espermatogoniais (SSCs) apresentam-se localizadas em micro-ambientes específicos denominados “nichos espermatogoniais”, que por sua vez regulam toda a atividade das células-tronco, incluindo manutenção, auto-renovação e diferenciação. Recentemente, vários estudos têm identificado fatores/proteínas específicas que regulam o destino das SSCs. Além disso, os mesmos visam identificar marcadores de superfície que possibilitem o isolamento dessas células em diferentes espécies de vertebrados. No nosso conhecimento, a presente investigação é a primeira a avaliar o nicho espermatogonial no testículo de cavalos e a realizar uma análise comparativa dos marcadores de espermatogônias indiferenciadas ( $A_{und}$ ) em três diferentes espécies domésticas de equídeos (cavalos, jumentos e burros). As  $A_{und}$  foram inicialmente caracterizadas de acordo com a morfologia e expressão do receptor GFRA1. Nossos resultados mostram que, à semelhança das poucas espécies de vertebrados já investigadas neste aspecto, as espermatogônias  $A_{und}$  em cavalos estão preferencialmente localizadas nas áreas adjacentes ao interstício, especialmente naquelas próximas a vasos sanguíneos. Além disso, os marcadores de espermatogônias  $A_{und}$  utilizados (GFRA1, PLZF, e CSF1R) foram identificados nas três espécies de equídeos aqui avaliados, sugerindo que os mecanismos moleculares envolvidos na fisiologia da espermatogônia-tronco e nicho parecem estar conservados em mamíferos.

Em relação à criopreservação de SSCs, condições adequadas para a estocagem destas células podem ser muito úteis em estudos envolvendo o transplante de SSCs e preservação do material genético de equídeos de alto valor zootécnico. Com o objetivo de se avaliar as taxas de sobrevivência das SSCs em cavalos, utilizando diferentes protocolos de criopreservação, as mesmas foram enzimaticamente isoladas dos testículos de 8 animais adultos. Após o enriquecimento em gradiente de Percoll, foi realizada imunomarcagem e *western blotting* para o receptor GFRA1 na suspensão celular e foi observado que a maioria das células germinativas obtidas expressava este receptor de membrana. Em seguida, três criomeios [DMSO + DMEM + SFB (1); etilenoglicol (2); DMSO + sacarose (3)] foram testados para a criopreservação usando duas taxas de congelamento (rápida e lenta) e a vitrificação. A viabilidade celular foi avaliada, antes e após o descongelamento, através de contagens celulares em câmara de Neubauer utilizando-se azul de Tripán como coloração intra-vital. Além disso, marcações para Anexina V e iodeto de propídeo também foram empregadas para se estimar a taxa de células apoptóticas e necróticas através de citometria de fluxo. A atividade metabólica e o potencial “tronco” destas células também foram avaliados realizando-se ensaios de MTT e imunomarcagem para GFRA1 e VASA, vinte e quatro dias em cultura, após o descongelamento. De acordo com as taxas de viabilidade celulares obtidas e o número de células recuperadas após o descongelamento, os melhores resultados foram encontrados nas amostras em que o DMSO foi utilizado como crioprotetor, associado a velocidades de congelamento rápida (criomeio 3) e lenta (criomeios 1 e 3). Ainda, os ensaios de MTT e de imunomarcagem indicaram que as SSCs criopreservadas apresentavam atividade metabólica semelhante às das células a fresco (não criopreservadas), e que as mesmas mantinham a expressão de proteínas que normalmente estão presentes nas SSCs (GFRA1 e VASA). Dessa forma, tais achados indicam que as SSCs de equinos podem ser criopreservadas com sucesso, sem que haja comprometimento da atividade metabólica e do potencial “tronco” destas células.

Esperamos que estes resultados auxiliem futuros estudos visando o isolamento e criopreservação das SSCs de equídeos e que também sejam úteis em estudos

relacionados com a preservação do material genético de animais valiosos, e com o transplante de células germinativas e xenoenxerto de suspensões de células testiculares.

## ABSTRACT

Spermatogonial stem cells (SSCs) are the foundation of spermatogenesis and are located in a highly dynamic microenvironment called “niche” that influences all aspects of stem cell function, including homing, self-renewal and differentiation. Several studies have recently identified specific proteins that regulate the fate of SSCs. These studies also aimed at identifying surface markers that would facilitate the isolation of these cells in different vertebrate species. The present study is the first to investigate SSC physiology and niche in stallions and to offer a comparative evaluation of undifferentiated type A spermatogonia ( $A_{und}$ ) markers (GFRA1, PLZF and CSF1R) in three different domestic equid animals (stallions, donkeys, and mules).  $A_{und}$  were first characterized according to their morphology and expression of the GFRA1 receptor. Our findings strongly suggest that in stallions these cells were preferentially located in the areas facing the interstitium, particularly those nearby blood vessels. This distribution is similar to what has been observed in other vertebrate species. In addition, all three  $A_{und}$  markers were expressed in the equid animals evaluated in this study. These markers have been well characterized in other mammalian species, which suggests that the molecular mechanisms that maintain the niche and  $A_{und}$ /SSCs physiology may be conserved among mammals.

Regarding spermatogonial cryopreservation, proper conditions for germ cells storage represent important biotechnological procedures for studies involving germ cells transplantation and the preservation of genetic stock of valuable animals. In order to evaluate the effects of different cryopreservation protocols on the survival rates of spermatogonial stem cells (SSCs) in horse, we enzymatically isolated SSCs from testis of 8 adult horses. After Percoll gradient enrichment of cell suspension, immunolabeling and western blotting for GFRA1 receptor (undifferentiated spermatogonial marker) demonstrated that most germ cells present in the suspension were GFRA1+. Also, three cryomedia [DMSO+DMEM+BFS (1); ethylene glycol (2); DMSO+sucrose (3)], associated with different methods (vitrification, slow and fast-freezing) were tested. The cell viability was evaluated before and post-thawing by trypan blue assay. Annexin V and propidium iodide assays were used to estimate the rate of apoptotic and necrotic cells post-thawing by flow cytometry. The cell metabolic activity and stemness potential were also evaluated post-thawing, using respectively, MTT assay and immunolabeling for GFRA1 and VASA after 24 days in culture. Based on the rates of viable SSCs before and post-thawing, as well as the number of recovered cells after cryopreservation, the best results were obtained utilizing the DMSO-based cryomedia at fast (Medium 3) and slow freezing methods (Media 1 and 3). In addition, the MTT data have indicated that cryopreserved cells were as metabolically active as fresh cells, and also they were expressing typical stem cell proteins (GFRA1 and VASA). Thus, the results have indicated that equine SSCs could be cryopreserved without impairment of their metabolic activity and stemness.

We hope that our findings will help future studies aiming the isolation and cryopreservation of equids SSCs. In addition, our data will be very useful for studies related to the preservation of the germplasm of valuable animals, and involving germ cell transplantation or xenografts of equids testicular cells suspensions.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>07</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>09</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>7. PERSPECTIVAS E ESTUDOS EM ANDAMENTO.....</b>	<b>33</b>
<b>8. LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>36</b>
Figura 1.....	37
Figura 2.....	38
Figura 3.....	39
Figura 4.....	40
Figura 5.....	41
Figura 6.....	42
Figura 7.....	43
Figura 8.....	44
Figura 9.....	45
Figura 10.....	46
Figura 11.....	47
Figura 12.....	48
Figura 13.....	49
Figura 14.....	50
Figura 15.....	51
Figura 16.....	52
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>10. ANEXOS (Artigo publicado) .....</b>	<b>63</b>

# **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

# 1. Introdução e Revisão de Literatura

## 1.1. Espermatogênese

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 eutérios já investigados (França & Russell, 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/ou progenitoras” e células comprometidas com a diferenciação. Estas células mais diferenciadas dão continuidade ao processo espermatogênico num intrincado processo de diferenciação e proliferação que ocorre até a última divisão mitótica originando os espermatócitos primários (pré-leptótenos); e a partir deste momento, tem-se o início da fase espermatocitária (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Griswold, 2012). Nesta etapa, ocorrem a duplicação do DNA, a recombinação gênica responsável pela variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie e a segregação dos cromossomos homólogos. Ao final desta longa fase, denominada de prófase I, subdividida em pré-leptóteno/leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, os espermatócitos secundários são formados. Após a segunda divisão meiótica, estes espermatócitos secundários dão origem a células haplóides denominadas espermátides arredondadas (Russell *et al.*, 1990; Hess & França, 2007). Estas espermátides constituem a fase espermiogênica na qual, através de complexo processo de diferenciação, que inclui a formação do acromossomo e do flagelo, a compactação do DNA (substituição das histonas por protaminas) e as mesmas se alongam para originar os espermatozóides. Estes últimos, após passarem pelo processo de maturação no epidídimo, estarão aptos a fertilizarem o oócito (Russell *et al.*, 1990; Hess & França, 2007).

## 1.2. Biologia e marcadores moleculares de células-tronco espermatogoniais

Para manter o processo espermatogênico e a homeostase testicular, os vertebrados contam com importantes populações de células-tronco germinativas denominadas espermatogônias (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Griswold, 2012). 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-embriônico, em direção à 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/ou

progenitoras”, 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 (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Griswold, 2012; Yoshida, 2012). 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, intermediária (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 (e.g., ruminantes e primatas) as espermatogônias do tipo B podem apresentar duas ou mais gerações (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Griswold, 2012). Em equinos e jumentos, já está bem estabelecido que espermatogônias  $A_{al}$  se diferenciam em espermatogônias  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$  que, posteriormente, dão origem às espermatogônias do tipo  $B_1$  e  $B_2$  (Johnson, 1991; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009).

Quando as espermatogônias mais iniciais sofrem divisões mitóticas, estas divisões são incompletas, fazendo com que as mesmas permaneçam conectadas entre si através de pontes citoplasmáticas, formando clones espermatogoniais cada vez maiores, dependendo do número de divisões. Tomando-se como ponto de referência a manutenção dos clones espermatogoniais, em espécies de mamíferos bem investigadas, as  $A_s$  foram caracterizadas como a população de espermatogônias-tronco mais basal (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Griswold, 2012; Yoshida, 2012). Assim, o início da espermatogênese ocorre com a divisão das espermatogônias-tronco, resultando em células filhas pareadas ( $A_{pr}$ ) que sofrem uma série de divisões mitóticas originando espermatogônias alinhadas  $A_{al}$  (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, uma série de divisões mitóticas ocorre, resultando na formação das espermatogônias  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$ , consecutivamente. As espermatogônias  $A_4$  darão origem a espermatogônias intermediárias e estas originarão as do tipo B, que por sua vez formarão os espermatozoides primários em pré-leptóteno (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Van Pelt, 2003; De Rooij & Griswold, 2012; Yoshida, 2012).

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, retornando a um estado mais indiferenciado, comportando-se como espermatogônias-tronco quando transplantadas em testículos de animais receptores (permitindo o desenvolvimento completo da espermatogênese), 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).

As espermatogônias são também consideradas células pluripotentes, podendo se diferenciar em diferentes tecidos somáticos (Simon *et al.*, 2009). Portanto, a

investigação da fisiologia das células-tronco espermatogoniais é um importante aspecto da biologia reprodutiva, propiciando melhor compreensão de algumas causas de infertilidade masculina e o desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas (Honaramooz *et al.*, 2011), além de serem úteis para investigações relacionadas à engenharia de tecidos (Simon *et al.*, 2009; Caires *et al.*, 2010). Neste contexto, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se identificar marcadores específicos para estas células em vertebrados (Revisado por Phillips *et al.*, 2010; Kolasa *et al.*, 2012). Particularmente, marcadores específicos para espermatogônias-tronco seriam muito úteis para se caracterizar e isolar estas células (Klisch *et al.*, 2011), permitindo a aplicação de diferentes biotecnologias com o intuito, por exemplo, de se preservar o genótipo de animais de alto valor zootécnico (Avarbock *et al.*, 1996).

Neste sentido, para se caracterizar fenotipicamente as espermatogônias-tronco grande destaque tem sido dado ao receptor do GDNF (*glial cell line-derived neurotropic factor*), o GFRA1 (GDNF factor receptor  $\alpha$ -1), que já está relativamente bem caracterizado, principalmente em roedores (Hofmann *et al.*, 2005; Oatley & Brinster, 2012). Outros marcadores específicos também têm sido caracterizados para estas células, como o 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 previamente descritos, tais como Pou5f1 (Oct4), Nanos2 e Nanos3 (Revisado por Phillips *et al.*, 2010; Kolasa *et al.*, 2012). Quanto às espermatogônias diferenciadas, o marcador mais utilizado tem sido o receptor c-KIT (*Tyrosine kinase receptor*), que se expressa em todos os tipos de espermatogônias diferenciadas, além de ser muito conservado evolutivamente entre as diferentes espécies de mamíferos (Schrans-Stassen *et al.*, 1999). Particularmente em equídeos, alguns estudos demonstraram que uma subpopulação específica de espermatogônias de cavalo (A<sub>s</sub>) apresenta padrão de glicosilação específica na superfície celular e esta mesma população de célula é positivamente marcada para a lectina DBA (*Lectina, Dolichos biflorus aglutinina*) (Verini-Supplizi *et al.*, 2000 ; Ha *et al.*, 2003; Klisch *et al.*, 2011) e com um anticorpo específico para carboidratos, conhecido como CT1 (Klisch *et al.*, 2011).

### 1.3. Nicho de células-tronco espermatogoniais

Na maioria dos sistemas auto-renováveis, a função das células-tronco adultas é garantida por microambientes denominados nichos (Oatley & Brinster, 2012; De Rooij & Griswold, 2012; Yoshida, 2012) que regulam, provavelmente através de fatores extrínsecos (estimulatórios ou inibitórios), 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 (Voog & Jones, 2010). Estes nichos de células-tronco têm sido estudados em vários sistemas nos quais ocorre alto índice de renovação celular, como na epiderme (Li & Clevers, 2010; Yang & Peng, 2010), intestino (Haegebarth & Clevers, 2009), medula óssea (Voog & Jones, 2010), ovário e testículos de invertebrados (Pałasz & Kamiński, 2009), bem como 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; Campos Junior *et al.*, 2012; Oatley & Brinster, 2012; Rooij & Griswold, 2012; Yoshida, 2012). De forma genérica e funcional, o nicho de células-tronco é definido como o microambiente específico que impede a diferenciação das espermatogônias mais indiferenciadas (Rooij & Griswold, 2012). Desta forma, o nicho é composto pelas próprias células-tronco, células somáticas adjacentes e matriz extracelular (Hofmann, 2005; Caires *et al.*, 2010; Oatley & Brinster, 2012). Nos testículos de algumas espécies de mamíferos eutérios, como camundongo (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001), rato (Chiarini-Garcia *et al.*, 2003), hamster (do Nascimento *et al.*, 2009) e jumento (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 do nicho espermatogonial é provavelmente a célula de Sertoli, a qual atua 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). 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 inovador desenvolvido recentemente, Nakagawa e colaboradores (2010) demonstraram que as espermatogônias de camundongos que apresentam maior expressão de receptor do GDNF (GFRA1) 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 GFRA1<sup>+</sup> estão comprometidas com o reestabelecimento da espermatogênese após a injúria (Nakagawa *et al.*, 2010).

À semelhança de outros sistemas de células-tronco adultas (ex.: folículo piloso, medula óssea e 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 sequência regulatória para neurogenina-3, Yoshida *et al.* (2007) observaram, através de microscopia intra-vital, que espermatogônias indiferenciadas localizam-se preferencialmente próximos a regiões de maior vascularização do 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. Recentemente, considerando-se a cito-arquitetura testicular única observada em catetos, onde as células de Leydig apresentam-se envolvendo lóbulos de túbulos seminíferos (Costa *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011; Campos Junior *et al.*, 2012), e utilizando-se critérios morfológicos e de imuno-marcação, foi observado que as espermatogônias A<sub>und</sub> (principalmente A<sub>s</sub> e A<sub>pp</sub>) apresentam localização preferencial pela região em contato com o compartimento intertubular sem células de Leydig. Estes achados sugerem fortemente que, pelo menos diretamente, o nicho espermatogonial não é dependente de células de Leydig, mas sim de fatores provenientes do compartimento intertubular, provenientes, por exemplo, dos vasos sanguíneos (Campos Junior *et al.*, 2012). Portanto, a proximidade das espermatogônias-tronco com a vascularização

sugere que fatores transportados pelo sangue, ou originados das células intersticiais, são importantes para a manutenção e diferenciação deste tipo celular.

#### **1.4. Criopreservação de células-tronco espermatogoniais**

O estabelecimento de condições adequadas para a criopreservação e armazenamento de células germinativas representa um importante avanço biotecnológico para o transplante de células germinativas (Avarbock *et al.*, 1996; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Diferentemente do congelamento de sêmen, onde uma quantidade finita de células é preservada, o congelamento e o armazenamento de células germinativas permitem preservar indefinidamente as linhagens de células espermatogênicas de espécies ameaçadas de extinção, animais experimentais valiosos ou animais de alto valor zootécnico. Outro aspecto muito importante a ser considerado é que o congelamento de espermatogônias preserva todo o potencial genético do macho, ao possibilitar que após o transplante essas células continuem dividindo e sofrendo recombinação gênica (“crossing-over”) durante a meiose, garantindo assim a variabilidade genética (Dobrinski, 2005). Num contexto bem amplo, ao serem criopreservadas as espermatogônias-tronco podem ser consideradas ‘imortais’ (Avarbock *et al.*, 1996).

Até o presente momento, estudos relacionados à criopreservação de espermatogônias indiferenciadas foram descritos em camundongos (Yuan *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012), bovinos (Izadyar *et al.*, 2002; Oatley *et al.*, 2004), macacos *rhesus* (Hermann *et al.*, 2007) e humanos (Mirzapour *et al.*, 2012). Estudo realizado mais recentemente demonstrou o transplante de células-tronco de equinos criopreservadas para os testículos de ratos (Ferrer *et al.*, 2011). No entanto, a técnica utilizada, bem como a eficiência da criopreservação, não foram descritas em detalhes. Desta forma, o presente estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de metodologias aplicadas à criopreservação destas células, uma vez que estudos neste campo específico do conhecimento são ainda escassos. Além das aplicações anteriormente citadas, deve ser considerado que, apesar de grandes avanços relacionados à criopreservação de sêmen de equinos terem sido alcançados na última década, ainda não existem protocolos ou metodologias com alta eficácia para o congelamento de espermatozoides para esta espécie (Sieme *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2011).

Diante deste contexto, o desenvolvimento da técnica de criopreservação de espermatogônias-tronco de equinos representa uma alternativa e importante ferramenta para a preservação dos recursos genéticos de animais de alto valor zootécnico, bem como de animais imaturos onde a criopreservação de espermatozoides claramente não é uma opção. Além disto, esta biotecnologia pode ser muito útil em estudos envolvendo transplante de espermatogônias-tronco, produção de equídeos transgênicos, engenharia de tecidos (transdiferenciação de espermatogônias-tronco) e xenoenxerto de fragmentos e suspensões de células testiculares em equinos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

Até o presente momento existem poucos relatos na literatura sobre a biologia e criopreservação espermatogonial em equídeos (Johnson, 1991; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; Klish *et al.*, 2011; Ferrer *et al.*, 2011). Desta forma, os principais objetivos do presente estudo foram:

- realizar avaliação morfofuncional do testículo de cavalo, especificamente no que se refere aos aspectos relacionados à cinética dos diferentes tipos espermatogoniais ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero;
- avaliar possíveis marcadores moleculares para as espermatogônias-tronco em equinos, realizando também análise comparativa envolvendo outros dois equídeos (jumentos e burros);
- investigar a presença de nicho das células-tronco espermatogoniais em equinos durante e fora do período reprodutivo;
- padronizar as técnicas de dissociação enzimática dos testículos de equinos e separação das espermatogônias-tronco, através de gradiente de Percoll;
- avaliar a presença de espermatogônias indiferenciadas no “pool” de células criopreservadas, investigando-se marcadores moleculares específicos (GFRA1) na suspensão celular através de imunohistoquímica e “western blot”;
- testar vários protocolos de criopreservação de espermatogônias-tronco utilizando-se três diferentes criomeios (dimetil sulfóxido + DMEM + 10% SFB; etileno-glicol; dimetil sulfóxido + sacarose), associados com três diferentes métodos de resfriamento (vitriificação, congelamento lento e congelamento rápido);
- analisar a viabilidade das células criopreservadas, após as mesmas serem descongeladas, através de citometria de fluxo; utilizando-se marcadores celulares como Anexina V (marcador de apoptose celular) e iodeto de propídeo (marcador de necrose celular);
- determinar o número de espermatogônias recuperadas após o descongelamento, através de contagens celulares, utilizando-se a câmara de Neubauer;
- avaliar, após o descongelamento, a sobrevivência e amplificação espermatogonial em cultura e investigar a expressão de proteínas normalmente encontradas em células germinativas (VASA) e espermatogoniais indiferenciadas (GFRA1).

# **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Marcadores moleculares e nicho de células-tronco espermatozoniais em equídeos

##### 3.1.1. Animais

Foram utilizados no presente estudo 14 cavalos (*Equus caballus*), 2 jumentos (*Equus asinus*) e 4 burros (*Equus mulus mulus*) adultos. Estes animais foram obtidos de diversas fazendas localizadas em Minas Gerais. Para cavalos, a amostragem foi adquirida através de orquiectomias durante o período reprodutivo (n = 7) e fora do período reprodutivo (n = 7), que no hemisfério sul vai de setembro a março e de abril a agosto, respectivamente. Testículos de jumentos e burros foram obtidos entre os meses de setembro a março. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por veterinários e seguiram orientações previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG # 056/11).

##### 3.1.2. Coleta e processamento dos testículos

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 4% 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 alcoóis - 70 a 100%) 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 e morfométricos foram utilizados microscópios Olympus BX-41 e BX-60IV. A documentação fotográfica também foi realizada utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX-60IV com lentes U-PlanApocromáticas, sistema de vídeo câmara digital UC50 da Olympus e o sistema de análise de imagens da Image-Pro Express da MediaCybernetics.

##### 3.1.3. Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em equinos através do método do sistema acrossômico

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero de cavalos foram caracterizados de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico nas espermátides (Russel *et al.*, 1990). Tendo como 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 espermatozônias e espermatócitos.

Os fragmentos de testículos coletados e fixados, conforme descrito no item 3.1.2, foram pós-fixados com tetróxido de 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. Após desidratação em álcoois e passagens por acetona, os fragmentos foram incluídos em resina araldite. Cortes semi-finos com 1 µm de espessura 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 diferentes tipos espermatogoniais. Em cada estágio do ciclo do epitélio seminífero caracterizado no presente estudo foram adquiridas cerca de 20 imagens para cada tipo espermatogonial presente. Estas espermatogônias foram agrupadas por estágio e classificadas de acordo com suas características morfológicas, utilizando-se os seguintes parâmetros: morfologia nuclear, presença e disposição de heterocromatina, granulosidade da eucromatina, morfologia e compactação nucleolar (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Chiarini-Garcia *et al.*, 2003; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; Campos-Junior *et al.*, 2012). Em seguida, cada um dos tipos espermatogoniais previamente classificados foram avaliados quanto ao volume nuclear e 30 espermatogônias de cada tipo foram mensuradas por animal.

#### **3.1.4. 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 µm de espessura foram obtidas. Estas secções foram aderidas em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da incubação dos cortes com solução de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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-GFRA1 (1:500, SC-6157, Santa Cruz Biotechnology), anti-PLZF (1:200, OP128, Calbiochem), anti-CSF1R (1:200, ab61137, Abcam) e Caspase-3 (1:300, Asp175, Cell Signaling Technology) “overnight” à 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com o anticorpo secundário biotinilado 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 contra-corados com Hematoxilina de Mayer. Com a finalidade de se quantificar o percentual de células que são positivas para GFRA1, PLZF e CSF1R, 200 espermatogônias indiferenciadas foram aleatoriamente avaliadas para cada cavalo (n = 6), jumento (n = 2) e burro (n = 4).

Nas análises de imunofluorescência, as secções histológicas foram desidratadas e submetidas à recuperação antigênica e ao bloqueio de ligações inespecíficas, conforme previamente descrito. Em seguida, foi realizada a incubação (marcação dupla) “overnight” com anticorpos primários: anti-GFRA1 (Santa Cruz Biotechnology, SC-

6157; 1:50) juntamente com anti-PLZF (mouse monoclonal, 1:200, OP128, Calbiochem); e anti-GFRA1 (Santa Cruz Biotechnology, SC-6157; 1:50) juntamente com anti-CSF1R (Abcam, Ab61137, 1:100). 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, as lâminas foram 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.

### **3.1.5. Western Blotting**

A técnica de “western blotting” foi utilizada para se avaliar a presença de proteínas GFRA1, PLZF e CSF1R no parênquima testicular de cavalos (durante e fora do período reprodutivo), jumentos e burros. Com este objetivo, amostras do parênquima testicular de cada animal foram congeladas separadamente em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C. Desta amostra total, e para cada animal, fragmentos de 300 mg foram separados para a extração das proteínas totais presentes. Para tal finalidade, foi adicionada solução de inibição de protease (Sigma Aldrich), que foi posteriormente homogeneizada e sonicada. Após a sonicação, o lisado tecidual foi centrifugado a 14.000 g por 20 minutos à 4 °C. 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 0,5 M de tampão TRIS, pH 6,8, e fervidas por 5 minutos. Após esta etapa, géis em 7,5% de SDS em poliácridamida foram preparados e inseridos 20 µL 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, uma corrente de 100-mA foi aplicada. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, por 60 minutos, utilizando-se corrente elétrica de 200-mA.

Ao término desta etapa, o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com a incubação da membrana em solução de 3% de BSA (Sigma Aldrich) em PBS, por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-GFRA1 (1:500), anti-PLZF (1:200) e anti-CSF1R (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 anti-cabra (para GFRA1; 1:100, ab6740, Abcam), anti-camundongo (para PLZF; 1:500, SAB4600004, Sigma) e anti-coelho (para CSF1R; 1:200, ab6720, Abcam), 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), cloronaftol (Sigma Aldrich), metanol e peróxido de hidrogênio (Sigma Aldrich), por

cerca de 1 minuto, sendo posteriormente digitalizadas em “scanner” Epson Perfection 4990.

### **3.1.6. Morfometria testicular**

A proporção volumétrica (%) dos componentes testiculares em cavalos foi determinada utilizando-se imagens obtidas através de microscopia de luz e com o auxílio de retículo com 540 pontos (intersecções) do software ImageJ (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para cada animal (n = 8), quinze campos/imagens (8100 pontos) aleatoriamente escolhidos por testículo, com aumento de 200X, foram analisados. Com a finalidade de se investigar a influência da sazonalidade nos componentes testiculares, os cavalos utilizados foram separados em dois grupos de quatro animais (dentro e fora do período reprodutivo).

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

Visando investigar a distribuição de espermatogônias  $A_{und}$  em equinos, avaliações morfológicas e de imunomarcção (GFRA1+) foram consideradas. Dessa forma, secções transversais de túbulos seminíferos de cada estágio foram fotografadas e subdivididas em quatro regiões definidas conforme se segue: I) adjacente a outro túbulo (Túbulo-Túbulo ou TT); II) adjacente ao interstício sem vasos sanguíneos (Túbulo-Interstício ou TI-VS); III) adjacente ao interstício contendo vasos sanguíneos (Túbulo-Interstício ou TI+VS); e IV) adjacente ao interstício contendo tecido conjuntivo (Túbulo-tecido conjuntivo ou TIC). Considerando-se que a circunferência tubular corresponde a 360 graus, o número de células  $A_{und}$  obtido para as quatro diferentes regiões avaliadas foi expresso por grau (Campos-Junior *et al.*, 2012). Portanto, esta abordagem permitiu a estimativa do número destas células localizadas em cada região. Além disso, para verificar os possíveis efeitos da sazonalidade na distribuição das células  $A_{und}$ , esta análise foi realizada em amostras de testículos coletados durante e fora do período reprodutivo. Com a finalidade de se verificar a distribuição destas células em áreas próximas à região intertubular e tubular, o número de  $A_{und}$  também foi expresso como número total de células por grau, considerando-se apenas duas regiões: TI (TI-VS, TI+VS e TIC); e TT.

### **3.1.8. Análises Estatísticas**

Os dados obtidos, nesta parte de nosso estudo, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, enquanto o teste "t" foi utilizado para análises envolvendo apenas dois parâmetros. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e o nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 3.2. Criopreservação de células-tronco espermatogoniais em equinos

### 3.2.1. Animais

Nesta parte do estudo, foram utilizados testículos de oito cavalos sexualmente maduros. Os testículos foram obtidos durante o período reprodutivo. Aproximadamente 50 gramas de parênquima testicular de cada animal foram utilizados para as digestões enzimáticas. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por veterinários e seguiram orientações previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG # 056/11).

### 3.2.2. Digestão enzimática testicular

Para o isolamento das células germinativas utilizamos o procedimento de dissociação enzimática, conforme descrito por Silva *et al.* (2012), com pequenas modificações. Resumidamente, os testículos foram digeridos com colagenase (2mg/mL, Sigma), hialuronidase (2mg/mL, Sigma) e DNase I (50 mg/mL, Sigma) dissolvidos em DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium – Cultilab), por 120 minutos e a 35 °C. O parênquima testicular dissociado foi em seguida sedimentado em HBSS (Hank's buffered salt solution free of  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) e, subsequentemente, incubado em tripsina 0,25%/1mM EDTA (Sigma) com 50 mg/mL DNase I (Sigma), por 20 minutos e a 35 °C. Volume igual de soro fetal bovino (FBS, Cultilab) foi adicionado para neutralizar a digestão pela tripsina. A suspensão celular resultante foi filtrada numa rede de 90 mm, centrifugada a 500g por 10 minutos e ressuspendida em DMEM contendo 100 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 IU/mL de penicilina, mais 5% de SFB.

### 3.2.3. Enriquecimento da suspensão celular utilizando-se gradiente de Percoll e plaqueamento diferencial

O enriquecimento da suspensão celular contendo espermatogônias-tronco foi obtido centrifugando-se a solução celular em dois diferentes gradientes de Percoll (35 e 25%) (Cultilab), seguido pelo plaqueamento diferencial (Lacerda *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012). No plaqueamento diferencial, as células ( $1 \times 10^8$  células) foram cultivadas em DMEM/F-12 (Nutrient Mixture F-12, Gibco Life Technologies) contendo 10% de FBS, 10000U/L penicilina, 10 mg/L de estreptomicina e 10 mM  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ . Estas placas de cultura com 60 cm<sup>2</sup> foram mantidas por 12 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 12 horas, as células que permaneceram suspensas no meio de cultura foram coletadas (Fração I). Subsequentemente, com o objetivo de se retirar as células germinativas fracamente aderidas às células somáticas localizadas no fundo das placas, as mesmas foram tratadas com 2 mL de tripsina diluída (1:20) em DPBS, à 37 °C. As células germinativas assim obtidas foram em seguida coletadas (Fração II). Já as células somáticas, que ficaram firmemente aderidas na placa de cultura (Fração III), foram descartadas. Desta forma, as células germinativas (principalmente espermatogônias) presentes nas frações I e II foram utilizadas para criopreservação, conforme será descrito adiante.

### 3.2.4. Imunohistoquímica e *western blotting* utilizando-se suspensão de células espermatogoniais

Com a finalidade de se determinar a homogeneidade da suspensão celular, ou seja, determinar a proporção de células-tronco espermatogoniais após o enriquecimento celular, foi realizada imunohistoquímica para proteína de superfície presente nestas células (GFRA1, ver trabalho publicado). As suspensões celulares foram incluídas em meio apropriado (Jung Tissue Freezing Medium; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha) e armazenadas à -80 °C. Após a inclusão, o material foi seccionado de forma seriada na espessura de 5µm, utilizando-se criostato à -30 °C (LEICA CM 1850; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha). Posteriormente, foi realizada imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo primário anti-GFRA1 (1:500, SC-6157, Santa Cruz Biotechnology). As demais etapas foram semelhantes à metodologia já descrita na seção 3.1.4.

Além da imunohistoquímica, a técnica de *western blotting* foi utilizada para se avaliar a presença da proteína GFRA1 na suspensão celular (após o enriquecimento celular) de cavalos. Com este objetivo, amostras das suspensões celulares de dois animais foram congeladas separadamente em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. Desta amostra total, 300 mg da suspensão de cada animal foram separados para a extração das proteínas totais presentes. Para tal finalidade, foi adicionada solução de inibição de protease (Sigma Aldrich), que foi posteriormente homogeneizada e sonicada. Após a sonicação, o lisado da suspensão foi centrifugado a 14.000 g por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e congelado a -80 °C. As demais metodologias para a análise das proteínas ocorreu de maneira semelhante ao já também descrito no item 3.1.5.

### 3.2.5. Meios crioprotetores e taxa de congelamento/resfriamento

Protocolos de criopreservação de células germinativas anteriormente descritos (Avarbock *et al.*, 1996; Izadyar *et al.*, 2002) foram adaptados e padronizados de acordo com os nossos objetivos, conforme segue abaixo.

Alíquotas de 500 µL da suspensão celular na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL foram distribuídas em criotubos de 1,5 mL (TPP). A essas alíquotas foi acrescido volume igual de meio crioprotetor resfriado (~4°C). Três diferentes criomeios (dimetil sulfóxido + DMEM + 10% SFB; etileno-glicol; dimetil sulfóxido + sacarose) foram testados. Todo esse processo foi realizado em banho de gelo (~4 °C) para a manutenção da baixa temperatura, evitando-se assim o efeito tóxico do DMSO e do etilenoglicol. Associado a estes três criomeios, três diferentes métodos de resfriamento (vitrificação, congelamento lento e congelamento rápido) foram avaliados. Para a vitrificação, os criotubos foram submersos em nitrogênio líquido (-196 °C) logo após a adição dos criomeios. Para o congelamento lento, foi utilizado recipiente especial (5100 Cryo 1°C Freezing Container, "Mr. Frosty", Nalgene) contendo álcool isopropílico, que permite taxa de resfriamento de -1 °C por minuto (Simione, 1998). Os criotubos foram armazenados no "freezer" -80 °C e, após 24 horas, transferidos para o botijão de nitrogênio líquido. Já no resfriamento rápido, os criotubos foram armazenados em

“freezer” -80 °C, sem estarem imersos no álcool isopropílico. Após 24 horas, os mesmos foram transferidos também para o botijão de nitrogênio líquido.

### **3.2.6. Marcação celular após o descongelamento utilizando-se Anexina V e iodeto de propídeo**

Após o descongelamento rápido em banho-maria, aproximadamente 5 segundos a 35 °C, as células criopreservadas foram então preparadas para dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo (ApopNexin FITC Apoptosis Detection Kit, Chemicon International). O mesmo procedimento foi realizado para amostras a fresco. As suspensões celulares foram centrifugadas duas vezes em solução de PBS resfriado para remoção do agente crioprotetor e posteriormente colocadas em solução específica conhecida como “binding-buffer” (1mL/10<sup>6</sup> células) para facilitar a ligação aos marcadores. Alíquotas de 200 µL da suspensão celular final foram incubadas com 3µL de Anexina V e 2 µL de iodeto de propídeo durante 15 minutos. Neste procedimento, células que se encontram em estágios iniciais de apoptose apresentam-se marcadas com anexina V-FITC, que emite fluorescência verde como resultado de sua ligação preferencial aos resíduos de fosfatidilserina translocados para superfície externa da membrana plasmática, no início do processo apoptótico. Já as células necróticas ou inviáveis foram marcadas por iodeto de propídeo, que emite fluorescência vermelha.

Os seguintes controles foram utilizados: células não coradas, células coradas somente com Anexina V, células coradas somente com iodeto de propídeo, na presença de indutor de apoptose (estaurosporina), e células fixadas com metanol.

### **3.2.7. Avaliação da proporção e número de células viáveis após o descongelamento**

Após a marcação das células com Anexina V e iodeto de propídeo, as células, mantidas ao abrigo da luz, foram avaliadas em citometria de fluxo (FACscan, BD Pharmingen). Em cada análise, 10.000 eventos foram registrados e o percentual de células viáveis de cada grupo foi estimada por meio do programa “CELLQuest Software” (CELLQuest, Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) e “Flow Jo” (Flow Cytometry Analysis Software, ©Tree Star, Inc.).

Além da proporção de células vivas e mortas, a contagem das mesmas foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer. Desta forma, alíquotas de 10 µL da suspensão celular foram misturadas com 10 µL de solução de azul de tripan (Trypan Blue Solution 0,4%, Sigma), na diluição de 1:1, para facilitar a quantificação das células vivas e mortas.

### **3.2.8. Ensaio de viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (Metil Tiazolil de Tetrazólio, Sigma, EUA) utilizando-se células a fresco e criopreservadas. Resumidamente, alíquotas de 180 µL da suspensão celular (1 x 10<sup>6</sup> células), em meio de cultura DMEM e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, BRASIL) foram incubadas durante 48 horas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços. Após a incubação, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço, e a placa incubada

por mais 4 horas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de reação, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e substituído por álcool isopropanol ácido (Vetec), seguido de agitação intensa. Após este procedimento, as placas de 96 poços foram levadas ao aparelho de ELISA ELX 800 (Universal Microplate Reader, Biotek Instruments Inc.) para leitura.

### **3.2.8. Cultivo e imunomarcação das espermatogônias-tronco após o descongelamento**

Além das análises de viabilidade celular, após o descongelamento as células foram cultivadas em DMEM/F-12 (Dubelcco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum, FBS, Cultilab, Camoinas, Brazil), 4,5 g/L de glicose (Sigma), 2,438 g/L de NaHCO<sub>3</sub> (Sigma), 1mM de piruvato de sódio (Sigma), 2nM de selenito de sódio (Sigma), 1mM de aminoácidos (Sigma), 100 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma), 100 UI/mL de penicilina (Sigma), e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma). A cultura foi mantida a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este cultivo, as células foram avaliadas qualitativamente de acordo com o padrão de confluência celular e características morfológicas das células. Além disso, foi realizada também imunomarcação para as células germinativas com a finalidade de se demonstrar que as células-tronco espermatogoniais estavam de fato presentes na cultura celular. Para isso, foi utilizado anticorpo primário anti-VASA (Abcam, ab13840; 1:200), e anti-GFRA1 (Santa Cruz Biotechnology, SC-6157; 1:50). Posteriormente, as placas de cultura 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.

## **4. RESULTADOS**

## 4. Resultados

### 4.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero, morfologia e cinética espermatogonial

#### 4.1.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) caracterizados através do método do sistema acrossômico

Baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico das espermátides, doze estádios do CES foram caracterizados em cavalos (Figura 1A; I-XII), nos quais a espermiogênese foi subdividida em 12 fases (1 – 12) que estão ilustradas em destaque na Figura 1A. O desenvolvimento das espermátides inicia-se na fase 1, nas quais, através de microscopia de luz, não foram observadas vesículas acrossômicas (Figura 1A; 1). Posteriormente, nas fases 2 a 5, ocorre a formação das vesículas acrossômicas que gradualmente tornam-se achatadas e aderem-se a superfície do núcleo das espermátides arredondadas; enquanto o ângulo formado pelo acrossomo na superfície do envoltório nuclear aumenta progressivamente nas fases subsequentes (Figura 1A; 6 - 7), atingindo valor máximo no estádio VIII (Figura 1A; 8). A partir do estádio IX, os núcleos das espermátides alongam-se gradual e progressivamente e o acrossomo torna-se orientado para a base do túbulo seminífero (Figura 1A; 9-12). Na fase 12, o núcleo das espermátides atinge sua condensação máxima e as mesmas movem-se progressivamente para a borda luminal do epitélio, sendo espermiadas no lúmen tubular no estádio VII. Dentre os doze estádios ciclo do epitélio seminífero caracterizados em cavalos, os estádios mais frequentes foram I, VII e XII, enquanto as menores frequências foram observadas para os estádios II, III, IV e XI (Figura 1B).

#### 4.1.2. Morfologia, volume e cinética espermatogonial

Os diferentes tipos espermatogoniais observados no epitélio seminífero de cavalos foram caracterizados baseados na morfologia nuclear e cinética (proliferação) destes tipos celulares, em associação com os estádios do ciclo do epitélio seminífero (Figura 1A), nos quais os mesmos estavam presentes (Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; Campos-Junior *et al.*, 2012).

Assim, de acordo com o padrão de heterocromatina e eucromatina, vacuolização nuclear e morfologia nucleolar, as células espermatogoniais foram caracterizadas como tipo A indiferenciadas ( $A_{und}$ ) e diferenciadas ( $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ ), e tipo B ( $B_1$  e  $B_2$ ) (Figura 2A). Dentre as  $A_{und}$  encontram-se as espermatogônias isoladas ( $A_s$ ), pareadas ( $A_{pr}$ ), e alinhadas ( $A_{al}$ ). No entanto, devido à ausência de critérios morfológicos específicos que permitiram distinguí-las, todas elas estão descritas como  $A_{und}$ . Em conjunto, as espermatogônias  $A_{und}$  apresentam o núcleo esférico e com muito pouca heterocromatina. Por outro lado, as espermatogônias  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$  possuem eucromatina com aspecto finamente granular, com aumento gradual na quantidade de heterocromatina de  $A_1$  a  $A_3$ . Já as espermatogônias do tipo  $B_1$  e  $B_2$  apresentavam núcleo ovóide, havendo também aumento na quantidade e granulosidade de heterocromatina. Através de análises morfométricas, foi observado que as espermatogônias  $A_2$

apresentavam maior volume nuclear, quando comparada aos demais tipos espermatogoniais ( $p < 0,05$ ; Figura 2B).

As espermatogônias  $A_{und}$  foram observadas em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero, enquanto as espermatogônias diferenciadas foram observadas em estádios específicos do ciclo (Figure 2C). Desta forma, as espermatogônias do tipo  $A_1$  foram encontradas nos estádios VII, VIII e IX, as  $A_2$  nos estádios X e XI,  $A_3$  nos estádios XII e I, as  $B_1$  nos estádios II, III e IV, e finalmente as  $B_2$  nos estádios V e VI. De maneira geral, a cinética espermatogonial indica aumento gradual no número celular durante a evolução de  $A_1$  a  $B_2$ . Conforme ilustrado na Figura 2D, a imunolocalização de caspase-3 ativa indicou maior frequência de apoptose em espermatogônias do tipo A. Já na cinética de espermatogônias  $A_{und}$  foi observado maior número destas células no estágio VI (Figura 2C), estágio próximo a espermição. No estágio seguinte (VII) ocorre abrupto decréscimo ( $p < 0,05$ ) da população das  $A_{und}$ , provavelmente em decorrência da diferenciação das mesmas em  $A_1$ .

## **4.2. Marcadores moleculares e nicho de células-tronco espermatogoniais em equídeos**

### **4.2.1. Fenótipo espermatogonial: imunolocalização de GFRA1, PLZF e CSF1R e *western blotting***

Para todas os três equídeos investigados, imunomarcção para GFRA1, PLZF e CSF1R foi observada em espermatogônias  $A_{und}$ . Apesar de utilizarmos análises em duas dimensões, células  $A_{und}$  isoladas, pareadas e alinhadas (Figura 3A, 4A, e 5A) puderam ser observadas. Enquanto a expressão do fator de transcrição PLZF foi limitada ao núcleo das espermatogônias  $A_{und}$  (4A; cabeças de setas), a expressão dos dois receptores GFRA1 e CSF1R foi específica para membrana e citoplasma destas células (Figuras 3A e 5A; cabeça de setas). A expressão das proteínas GFRA1 (~47KDa), PLZF (~80KDa), e CSF1R (~130 KDa) foi detectada e confirmada através de *immunoblotting* do lisado testicular total de cavalos (durante e fora do período reprodutivo), jumentos e burros (Figura 3B, 4B, 5B).

### **4.2.2. Percentual de espermatogônias $A_{und}$ marcadas para GFRA1, PLZF e CSF1R**

Esta análise foi realizada considerando-se as espermatogônias A isoladas ( $A_s$ ), pareadas ( $A_{pr}$ ) e alinhadas ( $A_{al}$ ) em equinos, jumentos e burros. Neste estudo, aproximadamente 90% das espermatogônias  $A_{und}$  presentes apresentaram marcação específica para GFRA1, enquanto aproximadamente 80% das  $A_{und}$  foram positivas para PLZF (Figuras 3C e 4C). Em contraste, apenas um terço destas células foram marcadas para CSF1R (Figura 5C). Com a finalidade de se ilustrar este aspecto em equinos, análise qualitativa foi realizada utilizando-se dupla marcação para os seguintes marcadores: GFRA1 juntamente com PLZF; e GFRA1 juntamente com CSF1R (Figura 6). Sugerindo que estas proteínas são diferencialmente expressas em subpopulações distintas de espermatogônias  $A_{und}$ , células GFRA1 positivas foram negativas para PLZF

ou CSF1R (Figura 6B e 6D). A Figura 6E sumariza os percentuais de imunomarcção das espermatogônias  $A_{und}$  para os três marcadores avaliados no testículo de cavalo.

#### **4.2.3. Análise morfométrica do testículo**

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular foi realizada em cavalos durante o período reprodutivo (Figura 7A, 1) e não-reprodutiva (Figura 7A, 2). Conforme pode ser observado, em ambos os períodos avaliados os túbulos seminíferos ocuparam cerca de 75% do parênquima testicular. No entanto, enquanto a metade do compartimento intertubular foi ocupado pelas células de Leydig durante o período reprodutivo, o tecido conjuntivo foi o componente predominantemente (~40%) observado neste compartimento durante a estação não-reprodutiva. A proporção volumétrica dos vasos sanguíneos foi muito semelhante nos dois períodos investigados. Com base no percentual dos componentes testiculares encontrados no parênquima do testículo, e com a finalidade de se investigar a distribuição espermatogonial em cavalos, secções transversais de túbulos seminíferos foram subdivididas em 4 diferentes regiões (Figura 7B) conforme já citado no item 3.1.7 do material e métodos.

#### **4.2.4. Distribuição espermatogonial**

De acordo com as quatro regiões dos túbulos seminíferos consideradas, e com base nas avaliações morfológicas e de imunomarcção para GFRA1 (Fig. 8A-P), observou-se que as espermatogônias  $A_{und}$  GFRA1+ estavam predominantemente localizadas ( $p < 0,05$ ) nas áreas dos túbulos seminíferos adjacentes ao compartimento intersticial contendo vasos sanguíneos (TI + VS) (Figura 8E-G e 8M-O). Em contraste, essa distribuição apresentou-se ao acaso nas outras três áreas investigadas. Conforme claramente evidenciado na Figura 8 (H e P), o número total de espermatogônias  $A_{und}$  localizadas próximas ao interstício (TI) é aproximadamente 3 vezes maior ( $p < 0,05$ ) do que em áreas de contato túbulo-túbulo (TT). Além disso, análises morfológicas e de imunohistoquímica evidenciaram que o padrão de distribuição das espermatogônias  $A_{und}$  não foi afetado pelo período reprodutivo em cavalos.

### **4.3. Criopreservação de células-tronco espermatogoniais em equinos**

#### **4.3.1 Obtenção das células germinativas para a criopreservação**

Os protocolos utilizados e padronizados para a obtenção de células germinativas de cavalos foram adaptações daqueles previamente descritos na literatura (Lacerda *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2012). Os resultados obtidos a partir destes protocolos sugerem que os mesmos foram bastante eficientes. Pois, com pequenas modificações, foi possível separar com relativa segurança os distintos tipos celulares presentes na suspensão celular, utilizando-se diferentes concentrações de Percoll. Neste sentido, com as maiores concentrações, 40 e 35%, foi possível enriquecer a suspensão celular contendo espermatogônias com a eliminação de células apresentando menores tamanhos, a exemplo das hemácias, espermatozóides (Figura 9A) e espermátides

arredondadas e alongadas (Figura 9B). Quando o Percoll a 25% foi utilizado, as células de nosso interesse, ou seja, as espermatogônias com características morfológicas de células mais imaturas foram observadas no *pellet* celular (Figura 9C). A confirmação deste achado foi possível por meio da identificação da proteína GFRA1 nestas células e no lisado desta suspensão celular, através de imunohistoquímica (Figura 9F) e *western blotting* (Figura 9G), respectivamente.

#### **4.3.2 Sobrevivência e cultivo celular após a criopreservação**

Após a criopreservação utilizando-se diferentes protocolos (Figura 10), as células de nosso interesse foram descongeladas e marcadas para Anexina V e iodeto de propídeo (Figura 11) e então submetidas a leituras em citometria de fluxo (Figura 12). Desta forma, foi possível observar que a proporção de células vivas nos protocolos de criopreservação lenta foram maiores quando comparados com os demais grupos experimentais, porém menor quando comparado com as células a fresco (Figura 13A). Confirmando estes resultados, a contagem celular em câmara de Neubauer (Figura 13B) demonstrou que as células criopreservadas através de congelamento lento foram as mais numerosas, particularmente aquelas que foram criopreservadas com criomeios contendo DMSO.

Após as análises quantitativas de sobrevivência das células germinativas criopreservadas, o cultivo celular foi feito para se verificar qualitativamente a atividade destas células (Figura 14-15). Assim, conforme seria de se esperar em decorrência dos resultados acima citados, as células em cultura que apresentaram maior crescimento após o descongelamento foram aquelas que haviam sido criopreservadas de maneira lenta (Figura 14 B e D), utilizando os criomeios contendo DMSO e soro fetal bovino (L1) ou DMSO contendo alta concentração de sacarose (L3). A criopreservação lenta utilizando o etilenoglicol (L2, Figura 14C), e a criopreservação rápida com criomeio contendo DMSO e alta concentração de sacarose (R3, Figura 15C), resultaram em menor proliferação celular quando comparadas com L1 e L3. A partir destes resultados, ensaios de viabilidade nestes grupos (L1, L2, L3 e R3) foram realizados conforme pode ser visto no item a seguir.

#### **4.3.3 Ensaio de viabilidade e imunomarcção de espermatogônias-tronco em cultura após o descongelamento**

Conforme pode ser observado nas figuras 16A e B, as células espermatogoniais foram capazes de reduzir o MTT (Metil Tiazolil de Tetrazólio) (Figura 16A) e formar cristais de formazan, os quais após serem solubilizados com isopropanol ácido, foram quantificados através de leitor de ELISA. Assim, foi observado que vinte e quatro dias após o descongelamento as células criopreservadas (L1, L2, L3, R3) apresentaram atividade metabólica semelhante às células frescas (Figura 16B). Adicionalmente, confirmando que de fato as células viáveis em cultura eram espermatogônias-tronco, imunomarcção positiva para VASA (Figura 16C) e GFRA1 (Figura 16D) foram observadas.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. Discussão

### 5.1. Marcadores moleculares e nicho de células-tronco espermatozoniais em equídeos

No nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a investigar o nicho espermatozonal em cavalos. Este estudo também envolve avaliação comparativa de marcadores de espermatozonias  $A_{und}$  em três diferentes equídeos (cavalos, burros e jumentos). Ainda com a finalidade de melhor compreender a dinâmica da espermatozogenese em equinos, os estádios do CES foram caracterizados de acordo com o desenvolvimento do acrossoma nas espermátides. Utilizando-se de critérios morfológicos e marcadores moleculares, os diferentes tipos de espermatozonias nesta espécie foram também caracterizados, bem como a distribuição espacial destas células, em quatro diferentes regiões previamente definidas em secções transversais de túbulos seminíferos. Os resultados para a distribuição de espermatozonias GFRA1 positivas sugerem fortemente que, à semelhança de outras espécies de vertebrados já investigadas, as espermatozonias  $A_{und}$  em cavalos estão preferencialmente localizadas em áreas adjacentes ao interstício, particularmente naquelas próximas aos vasos sanguíneos. Além disso, a expressão dos três marcadores de espermatozonias  $A_{und}$  investigados (GFRA1, PLZF e CSF1R) foi detectada nos testículos de cavalos, burros e jumentos, através de análises de imunohistoquímica e *Western blot*. Estes achados sugerem que os mecanismos moleculares que regulam a fisiologia das espermatozonias-tronco e a manutenção do nicho estão conservados em mamíferos.

O receptor de membrana GFRA1 tem sido considerado um dos marcadores classicamente mais aceitos para espermatozonias  $A_{und}$  (Hofmann *et al.*, 2005). Desta forma, a presença de GFRA1 na superfície destas células germinativas tem sido descrita em camundongos (Jing *et al.*, 1996; Baloh *et al.*, 2000; Dettin *et al.*, 2003; von Schonfeldt *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2005), suínos (Kuijk *et al.*, 2004), gatos domésticos (Powell *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012), catetos (Campos-Junior *et al.*, 2012), primatas não humanos (Hermann *et al.*, 2007; Hermann *et al.*, 2009; Maki *et al.*, 2009; Gassei *et al.*, 2010) e em humanos (Gassei *et al.*, 2010; Spinnler *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012). No entanto, o presente estudo é o primeiro a descrever a expressão de GFRA1 em espermatozonias  $A_{und}$  de equídeos. Assim, acreditamos que, à semelhança de camundongos (Treanor *et al.*, 1996; Worby *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 2005), o GFRA1 pode ser considerado um importante fator para a auto-renovação e manutenção das SSCs em equídeos. Neste contexto, as análises quantitativas, confirmadas qualitativamente por *Western blot*, revelaram elevada prevalência de espermatozonias  $A_{und}$  positivas para GFRA1 (~90%) nos testículos de cavalos, jumentos e burro, indicando que todos os subtipos de  $A_{und}$  ( $A_s$ ,  $A_{pr}$  e  $A_{al}$ ) expressam esse receptor. O percentual de espermatozonias  $A_{und}$  GFRA1 positivas encontrado no presente trabalho é semelhante aos valores observados em catetos (~93%) (Campos-Junior *et al.*, 2012) e camundongos (90%) (Grisanti *et al.*, 2009). Como as espermatozonias A isoladas ( $A_s$ ) representam aproximadamente 10% do total de espermatozonias  $A_{und}$  (Tegelenbosch and de Rooij, 1993; de Rooij & Russell, 2000),

acreditamos que todos os subtipos de espermatogônias  $A_{und}$  foram marcados com GFRA1 nas três diferentes espécies de equídeos investigadas. No entanto, com a finalidade de se determinar com precisão se todos os subtipos das espermatogônias  $A_{und}$  expressam GFRA1, mais estudos são ainda necessários, tais como análises “in toto” dos túbulos seminíferos (Grasso *et al.*, 2012). Além disso, estudos envolvendo a avaliação de possíveis mudanças na expressão de GDNF (ligante do GFRA1) nas células de Sertoli ao longo dos estágios do epitélio seminífero em cavalos, conforme já observado em ratos (Johnston *et al.*, 2011) e camundongos (Grasso *et al.*, 2012), também são necessários.

Embora um pouco menos frequente, a expressão do fator de transcrição PLZF foi observada em aproximadamente 80% das espermatogônias  $A_{und}$  em equídeos. Este resultado, também confirmado através de ensaios de *Western blotting*, é semelhante aos achados descritos para coelhos (Hermann *et al.*, 2010). O PLZF também é altamente conservado em mamíferos, e considera-se que o mesmo esteja envolvido na auto-renovação e manutenção de SSC em camundongos (Buaas *et al.*, 2004; Costoya *et al.*, 2004), ovinos (Borjigin *et al.*, 2010), coelhos e primatas (Hermann *et al.*, 2007; Hermann *et al.*, 2009; Hermann *et al.*, 2010). Com base nestes resultados, assume-se que o PLZF seja importante na fisiologia das espermatogônias  $A_{und}$  e/ou espermatogônias-tronco em equídeos. Em camundongos já é sabido que a atividade do PLZF reprime a expressão gênica de *Kit* e *Crtc1*, cujos produtos estão envolvidos na diferenciação das espermatogônias (Filipponi *et al.*, 2007; Hobbs *et al.*, 2010). Além disso, o PLZF é também co-expresso com o Oct4, que representa importante marcador de pluripotência de células-tronco primitivas. Portanto, em nosso entendimento, futuras investigações necessitam abordar estas questões em equídeos.

No presente estudo, foi também observado que, à semelhança de camundongos (Oatley *et al.*, 2009; Kokkinaki *et al.*, 2009), apenas um terço das espermatogônias  $A_{und}$  expressam o receptor para o fator estimulador de colônia-1 (CSF1R). A expressão de CSF1R no testículo de equídeos foi igualmente validada por ensaios de *Western blotting*. Em catetos, duplas marcações de imunohistoquímica demonstraram que espermatogônias  $A_{und}$  positivas para CSF1R expressavam GFRA1 (Campos-Junior *et al.*, 2012). Outros estudos demonstraram a expressão de CSF1R em populações enriquecidas de células germinativas de camundongos positivas para THY1 (Oatley *et al.*, 2009) e GFRA1 (Kokkinaki *et al.*, 2009). Pelo fato do fator estimulador de colônia-1 (CSF1) ser secretado pelas células de Leydig e células peritubulares mióides em camundongos (Oatley *et al.*, 2009) e catetos (Campos-Junior *et al.*, 2012), seria interessante investigar o papel destas células somáticas na regulação da fisiologia das espermatogônias  $A_{und}$  em equídeos.

Ao se comparar os dados obtidos para roedores (Jing *et al.*, 1996; Baloh *et al.*, 2000; Dettin *et al.*, 2003; von Schonfeldt *et al.*, 2004; Buaas *et al.*, 2004; Costoya *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2005; Oatley *et al.*, 2009; Grisanti *et al.*, 2009; Kokkinaki *et al.*, 2009), catetos (Campos-Junior *et al.*, 2012), e equídeos investigados no presente estudo, com aqueles encontrados para primatas, observa-se que o fenótipo das espermatogônias  $A_{und}$  do homem (Ehmcke & Schlatt, 2006; Hermann *et al.*, 2010) e primatas não-humanos (Ehmcke & Schlatt, 2006; Aeckerle *et al.*, 2012) parece ser um pouco

diferente, principalmente em relação a expressão de marcadores de pluripotência (LIN28 e POU5F1) (Aeckerle *et al.*, 2012). Além disso, dados recentes demonstram que grande número de citocinas e fatores de crescimento, tais como GDNF e CSF1, são produzidos por células peritubulares mióides. Indicando assim, que estas células também participam ativamente na regulação da auto-renovação e nicho das SSC (Campos-Junior *et al.*, 2012, Spinnler *et al.*, 2010, Albert *et al.*, 2012). Desta forma, estudos envolvendo a participação funcional das células peritubulares mióides no nicho de células-tronco espermatogoniais em equídeos necessitam também ser desenvolvidos.

No nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a investigar o padrão de distribuição de espermatogônias GFRA1 positivas em equídeos. Os resultados por nós encontrados sugerem fortemente que o interstício, mais especificamente o sistema vascular, pode desempenhar papel importante na regulação da SSC em equídeos, conforme previamente descrito para outras espécies (Yoshida *et al.*, 2007; Campos-Junior *et al.*, 2012). Nossos resultados demonstram claramente que espermatogônias  $A_{und}$  positivas para GFRA1 em cavalos estão preferencialmente localizadas em áreas dos túbulos seminíferos adjacentes aos vasos sanguíneos. Pelo fato de nenhum fator proveniente dos vasos sanguíneos que regula o nicho espermatogonial ter sido descrito, este importante aspecto pode ser apenas um ponto de referência indireto para a localização do mesmo. Entretanto, diferentes pesquisadores têm sugerido que a concentração do hormônio folículo-estimulante (FSH) é maior perto dos vasos sanguíneos (Simon *et al.*, 2007; de Rooij, 2009). Desta forma, o FSH poderia estimular a produção de GDNF pelas células de Sertoli, criando assim um microambiente específico para as espermatogônias  $A_{und}$  (Simon *et al.*, 2007; de Rooij, 2009).

Devido às drásticas alterações encontradas para percentual/distribuição dos elementos que compõem o compartimento intertubular, nicho espermatogonial evidente não foi observado em hamsters durante o período de inatividade sexual (do Nascimento *et al.*, 2009). No presente estudo, não foram notadas quaisquer diferenças no padrão de distribuição de espermatogônias  $A_{und}$  durante e fora do período reprodutivo em cavalos. Estes achados podem estar relacionados ao fato de que em países onde a variação do fotoperíodo anual é inferior a duas horas, os efeitos da sazonalidade não são suficientes para promover mudanças significativas nos elementos que compõem o compartimento intersticial em cavalos (Berndtson *et al.*, 1983). Em estudos desenvolvidos no Texas (EUA), o número total de espermatogônias do tipo A (indiferenciadas e diferenciadas) foi significativamente menor em cavalos durante o período não-reprodutivo (Johnson, 1985; Johnson & Thompson, 1987).

Baseado nas associações dos diferentes tipos de células germinativas e no desenvolvimento do acrossoma, doze estádios do CES foram caracterizados no presente estudo. Esta caracterização foi semelhante àquela descrita previamente para jumentos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2009), diferindo no entanto daquela utilizando o sistema da morfologia tubular, no qual oito estádios do CES são sempre caracterizados (Swierstra *et al.*, 1974; Johnson *et al.*, 1990a; Johnson *et al.*, 1990b). Os valores percentuais encontrados para as frequências dos doze estádios por nós caracterizados na presente investigação, bem como para o agrupamento das frequências das fases pré e pós-meióticas, foram semelhantes aos valores encontrados para jumentos (Chiarini-Garcia *et*

*al.*, 2009). Estes achados reforçam hipótese desenvolvida em nosso laboratório de que as frequências destas duas fases parecem ser filogeneticamente estabelecidas entre membros de uma mesma família (Hess & França, 2007; França & Russell, 1998).

Os diferentes tipos espermatogoniais em cavalos apresentam características morfológicas similares àquelas previamente descritas em jumentos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2009). De maneira interessante, o volume nuclear destas espermatogônias, cujo valor máximo foi observado para as espermatogônias do tipo A<sub>2</sub>, apresenta padrão semelhante aos valores encontrados em camundongos (Auharek & França, 2010). Ainda, à semelhança do observado na literatura (de Rooij & Russell, 2000; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009), aumento gradual no número de espermatogônias do tipo A<sub>1</sub> até o tipo B<sub>2</sub> foi observado em cavalos. Entretanto, provavelmente devido à elevada incidência de apoptose ou “checkpoints” que naturalmente ocorrem durante a fase espermatogonial (de Rooij & Russell, 2000; Russell *et al.*, 2002), significativa perda de células germinativas foi observada, particularmente na transição de espermatogônias do tipo A para o tipo B (Chiarini-Garcia *et al.*, 2009). A cinética das espermatogônias A<sub>und</sub> seguiu a mesma tendência observada em roedores (de Rooij & Russell, 2000), jumentos (Chiarini-Garcia *et al.*, 2009) e catetos (Campos-Junior *et al.*, 2012). Assim, menor número de espermatogônias indiferenciadas foi observado no estágio VII do CES, fase esta em que ocorre a espermição e diferenciação das espermatogônias A<sub>und</sub> para espermatogônias do tipo A<sub>1</sub> (de Rooij & Russell, 2000; Chiarini-Garcia *et al.*, 2009; Campos-Junior *et al.*, 2012).

Em síntese, os resultados por nós encontrados para espermatogônias neste item do presente estudo sugerem que os mecanismos moleculares que regulam a fisiologia das SSC e a manutenção do nicho espermatogonial parecem estar conservados em mamíferos. Além disso, a caracterização das espermatogônias A<sub>und</sub> realizada no presente trabalho fornece, pela primeira vez, sólida base para estudos futuros acerca da auto-renovação e diferenciação das SSC em equídeos. Conforme discutido a seguir, tais achados auxiliaram sobremaneira no isolamento/enriquecimento e a criopreservação destas importantes células-tronco. Finalmente, os resultados aqui apresentados podem ser bastante úteis em estudos envolvendo transplantes de espermatogônias-tronco e xenoinxertos de fragmentos e suspensões de células testiculares de equídeos. Estes importantes aspectos serão abordados mais detalhadamente no item de perspectivas, abordado no final do presente estudo.

## 5.2. Criopreservação de células-tronco espermatogoniais em equinos

Existem na literatura poucas informações acerca da criopreservação de células-tronco espermatogoniais. Particularmente para equinos, apenas um trabalho (Ferrer *et al.*, 2011) utilizou células criopreservadas para realizar o transplante de espermatogônias para o testículo de ratos imunocompetentes. Nesta investigação, os protocolos previamente estabelecidos para bovinos (Izadyar *et al.*, 2002) foram utilizados, consistindo de congelamento rápido associado com o uso de criomeio específico (dimetil sulfoxido + DMEM + 10% SFB), que também foi testado no

presente estudo. Entretanto, importantes informações acerca da viabilidade e número de células recuperadas após a criopreservação não foram fornecidas neste relato.

Apesar da composição lipídica da membrana plasmática ser considerada como principal fator relacionado às variações das taxas de sobrevivência obtidas com protocolos de criopreservação, diversos estudos mostram que outros fatores inerentes à raça, espécie, tipo de célula e outros fatores tais como a nutrição e a estação do ano, parecem afetar a criotolerância celular (Seidel, 2006; Leibo & Pool, 2011). Desta forma, fica evidente que o emprego de protocolos de criopreservação descritos com sucesso para algumas espécies, não necessariamente se aplicarão de maneira satisfatória às demais (Peña *et al.*, 2011). Conforme será discutido a seguir, nossos resultados demonstram que os melhores resultados para criopreservação de células-tronco espermatogoniais de equino ocorre com a criopreservação lenta, o que difere da metodologia utilizada por Ferrer e colaboradores (2011).

Em relação à velocidade de criopreservação, existem dois fatores principais que podem levar à morte celular durante o processo de congelamento/descongelamento, quer seja, a formação de cristais intracelulares de gelo e o choque osmótico. Durante o processo de congelamento, a célula e seu meio externo atingem inicialmente estado de super-resfriamento que causa a formação de gelo no meio extracelular, enquanto os componentes da célula super-resfriada permanecem descongelados. Fato este que acarreta aumento de osmolaridade. Com este desequilíbrio osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando assim a desidratação celular (Mazur, 2010; Peña *et al.*, 2011). Uma adequada desidratação celular depende da velocidade do congelamento de forma a não provocar a lise da célula. No caso do congelamento lento, a célula fica exposta ao crioprotetor e ao estresse osmótico por tempo prolongado, o que pode acarretar a morte celular. Por outro lado, se a célula for congelada rapidamente a desidratação por congelamento não ocorre, podendo ocorrer formação de cristais de gelo intracelulares que causam injúria mecânica às células (Peña *et al.*, 2011). Desta forma, o sucesso da criopreservação das células depende da velocidade do congelamento, da composição da solução (criomeios) e da própria estrutura celular. Apesar da citotoxicidade moderada apresentada pelo dimetilsulfóxido (DMSO) (Brayton, 1986; Sojka, 1990; Stone, 1993), no presente trabalho, tanto para as técnicas de congelamento lento (controlado) quanto para aquele rápido (não controlado), as amostras contendo DMSO apresentaram maior viabilidade das espermatogônias quando comparadas àquelas contendo etilenoglicol.

No presente estudo, também avaliamos de forma detalhada os procedimentos necessários para a digestão do parênquima testicular de equinos, realizando pequenas modificações nos protocolos de digestão enzimática dupla previamente utilizados para gatos-domésticos (Silva *et al.*, 2012) e tilápias-nilóticas (Lacerda *et al.*, 2010). Conforme salientado anteriormente, existem diferentes protocolos de criopreservação para diferentes tipos celulares, os quais obviamente apresentam distintas composições (Seidel, 2006; Leibo & Pool, 2011). Desta forma, no presente trabalho, após a digestão enzimática, tivemos o cuidado de selecionar as células de acordo com a densidade individual das mesmas, garantindo assim maior homogeneidade do tipo celular a ser criopreservado. Adicionalmente, fomos capazes de demonstrar através de marcadores

moleculares, que células-tronco espermatogoniais estavam presentes em grande número na suspensão celular criopreservada, permitindo assim avaliar com maior precisão os efeitos da criopreservação neste tipo celular específico. Já no estudo desenvolvido por Ferrer e colaboradores (2011), os mesmos fizeram uma única digestão enzimática no testículo de equinos e criopreservaram toda a suspensão celular. Nesse sentido, torna-se mais difícil determinar a eficiência da criopreservação de espermatogônias-tronco, uma vez que existem outros tipos de células germinativas nesta suspensão.

Os resultados obtidos para a criopreservação das espermatogônias de equinos foram bastante similares aos valores obtidos para a maioria dos trabalhos na literatura envolvendo a criopreservação de espermatogônias em mamíferos. Assim, as melhores taxas de sobrevivência celular são observadas quando o crioprotetor contendo DMSO é utilizado (Herman *et al.*, 2007; Izadyar *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2011). Este crioprotetor já foi testado com sucesso para primatas não humanos (Herman *et al.*, 2007), bovinos (Izadyar *et al.*, 2002) e camundongos (Wu *et al.*, 2012), apresentando taxas de viabilidade celular semelhantes às obtidas no presente estudo para equinos (~60%). Em particular, quantificamos pela primeira vez, as espermatogônias viáveis realizando dupla marcação para Anexina V (marcador de apoptose) e iodeto de propídeo (marcador de necrose celular), o que torna os nossos resultados muito confiáveis uma vez que a quantificação é feita em citometria de fluxo. Em alguns estudos, apesar de empregarem o DMSO no criomeio utilizado, os pesquisadores não informam a taxa de viabilidade celular após o descongelamento (Yuan *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2011).

Até o presente momento, estudo com a finalidade de se verificar a atividade metabólica das células espermatogoniais criopreservadas em cultura havia sido descrito apenas para bovinos (Izadyar *et al.*, 2002). Neste sentido, com a finalidade de se estimar o melhor protocolo de criopreservação, em nosso estudo as células de equinos em cultura também foram testadas e quantificadas em relação à atividade proliferativa/metabólica usando um sal específico (MTT), que se precipita quando estas células estão metabolicamente ativas (Izadyar *et al.*, 2002). Assim, intensa proliferação das células criopreservadas após quatro dias de cultivo celular foi observada. Resultado este bastante similar ao encontrado para bovinos (Izadyar *et al.*, 2002). Além disso, após quatorze dias de cultivo celular, as células após o descongelamento apresentaram uma atividade metabólica similar às células a fresco em cultura. Apesar das células de bovinos terem sido avaliadas com um menor tempo de cultivo celular, resultado bastante semelhante ao de equinos foi observado (Izadyar *et al.*, 2002).

No presente estudo foi possível observar a amplificação das espermatogônias criopreservadas em cultura após o descongelamento. Esta viabilidade espermatogonial ficou mais evidente com expressão de proteínas como VASA e GFRA1. Estudos desenvolvidos com a criopreservação de espermatogônia de camundongos demonstraram que as espermatogônias criopreservadas, quando cultivadas por muito tempo (14 meses), eram capazes de manter seu “status” indiferenciado, apresentando assim marcação positiva para THY1 e OCT4, e apresentando também cariótipo normal após 65 passagens ou trocas de meio de cultura nas placas (Yuan *et al.*, 2009). Posteriormente, foi realizado o transplante destas células germinativas criopreservadas

em testículos de camundongos que tiveram a sua espermatogênese endógena depletada. Estas células foram capazes de colonizar o testículo do animal receptor, ocorrendo espermatogênese completa do animal doador com produção de espermatozoides, e mesmo a formação de prole com características genéticas do animal doador (Yuan *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2011). Diante deste contexto, pretendemos realizar o transplante das espermatogônias de equino criopreservadas para o testículo de camundongos com o intuito de se observar a capacidade de colonização e proliferação destas células. Futuramente, pretendemos ainda transplantar estas células criopreservadas para o testículo de burros com o objetivo de verificar a capacidade de diferenciação destas células, incluindo-se a produção de espermatozoides.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. Conclusões

No nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a investigar o nicho espermatogonial em cavalos e a realizar avaliação comparativa de marcadores para espermatogônias  $A_{und}$  em três diferentes equídeos (cavalos, jumentos e burros). Com base na distribuição das espermatogônias GFRA1 positivas, nossos resultados mostram que, à semelhança das poucas espécies de vertebrados já investigadas neste aspecto, as espermatogônias  $A_{und}$  em cavalos estão preferencialmente localizadas nas áreas adjacentes ao interstício, especialmente naquelas próximas a vasos sanguíneos. Além disso, todos os três marcadores de espermatogônias  $A_{und}$  utilizados (GFRA1, PLZF, e CSF1R) estavam presentes nas espécies de equídeos aqui avaliadas, sugerindo que os mecanismos moleculares envolvidos na fisiologia da espermatogônia-tronco e nicho espermatogonial parecem estar conservados em mamíferos.

Em relação à criopreservação de espermatogônias, o presente estudo também foi o primeiro a demonstrar a eficiência desta biotécnica em cavalos utilizando diferentes tipos de protocolos. De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que o protocolo de criopreservação utilizando DMSO como crioprotetor, associado ao congelamento lento, além de garantir alta viabilidade celular aparentemente preserva as características fisiológicas/moleculares das espermatogônias-tronco. Certamente, esta biotecnologia auxiliará na preservação do genótipo de animais de alto valor zootécnico, além de ser muito útil em estudos envolvendo o transplante de espermatogônias, produção de animais transgênicos, engenharia de tecidos (transdiferenciação de espermatogônias-tronco) e xenoenxerto de suspensões celulares em equinos.

## **7. PERSPECTIVAS E ESTUDOS EM ANDAMENTO**

## 7. Perspectivas e Estudos em andamento

Conforme pode ser observado no esquema abaixo, o presente estudo abordou importantes aspectos acerca da fisiologia, marcadores moleculares e nicho espermatogonial em equídeos, e ainda padronizou importante biotecnologia relacionada à criopreservação de células-tronco espermatogoniais em equinos. Os resultados aqui obtidos propiciaram um novo cenário para estudos envolvendo o transplante de espermatogônias-tronco, utilizando-se o burro como animal receptor de células germinativas de cavalos. Além disso, o desenvolvimento de xenoenxerto de fragmentos testiculares e de suspensões de células testiculares em equídeos torna-se possível. Estas possíveis abordagens estão melhores detalhadas nos parágrafos seguintes.

### RESULTADOS ENCONTRADOS NO PRESENTE ESTUDO



O xenoenxerto de células testiculares isoladas é uma abordagem experimental, na qual se observa a habilidade morfogenética das células testiculares isoladas em reconstituir um “testículo funcional”, sob a pele dorsal de camundongos imunodeficientes (SCID) (Honaramooz et al., 2007; Kita et al., 2007; Arregui et al., 2008). Num outro contexto, apesar da espermatogênese não ultrapassar a fase meiótica em burros, estudos desenvolvidos em nosso laboratório sugerem que as células somáticas do testículo dos mesmos são funcionais (Neves *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2005). Assim, com a finalidade de se investigar a capacidade de interação destas células com as células germinativas de equinos, em estudos preliminares desenvolvidos em nosso laboratório, testículos de burros e equinos jovens foram digeridos, conforme técnicas por nós padronizadas. Após esta etapa, as suspensões celulares obtidas foram enxertadas no tecido subcutâneo da região dorsal de camundongos imunodeficientes. Os resultados preliminares mostram que a taxa de recuperação dos tecidos formados com 3, 5, 6 e 8 meses após o xenoenxerto foi de aproximadamente 60%. A avaliação histológica inicial dos tecidos desenvolvidos a partir das células de burro ou cavalo mostrou que as células em suspensão foram capazes de interagir adequadamente e a interação entre as mesmas resultou na formação “*de novo*” do testículo. Dessa forma,

nos testículos formados nos diferentes períodos de tempo investigados foram observados a presença da rede testicular e de cordões/túbulos seminíferos constituídos por células de Sertoli e, particularmente em burros, células da linhagem germinativa que se encontravam na fase espermatogonial. Experimentos nos quais o co-xenoinxerto de células de burros e equinos foram realizados também encontram-se atualmente em andamento. Nestes experimentos, as células somáticas (ex: Sertoli, Leydig e peritubulares mióides) utilizadas originaram-se de burros, enquanto as células da linhagem germinativa foram obtidas de equinos. Resultados preliminares mostram que as células somáticas do burro reconhecem as células germinativas do equino, e que a interação entre as mesmas resulta na formação de uma gônada masculina “quimérica”, na qual é observada a presença de células germinativas pós-meióticas. Considerando-se as características da espermatogênese do burro, pode-se sugerir que estas células pós-meióticas sejam derivadas das células germinativas obtidas do equino doador.

Finalmente, o transplante de espermatogônias é uma biotécnica que foi desenvolvida inicialmente por Brinster e colaboradores em 1994 (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994). Esta técnica consiste na transferência de espermatogônias-tronco de um doador fértil para o testículo de um receptor infértil, onde estas células se desenvolvem e formam espermatozóides férteis com características genéticas do doador. Nosso estudo em andamento é o primeiro a abordar o transplante de espermatogônias-tronco em equídeos. Até o presente momento, foram utilizados dois burros (animal infértil) como receptores de células germinativas (espermatogônias-tronco) de cavalos. A técnica de transplante foi cirúrgica, ou seja, foi realizada uma incisão no escroto com a exposição dos testículos. Aproximadamente seis meses após o transplante, foi possível observar a presença de espermatozóides no ejaculado do burro. Com a finalidade de se demonstrar geneticamente se estes espermatozóides são derivados do animal doador, testes genéticos estão sendo realizados. Neste estudo, também estamos padronizando o uso do ultrassom em testículos de burros para que o procedimento (injeção das células germinativas na rede testicular) seja realizado sem a necessidade de intervenção cirúrgica. Portanto, ao final destes experimentos, pretendemos demonstrar que o burro é um receptor viável para o transplante de espermatogônias-tronco em equídeos, permitindo assim preservar, por exemplo, o genoma de animais com alto valor zootécnico, além de propiciar o desenvolvimento de importantes biotecnologias envolvendo o melhoramento animal, bem como a investigação da biologia das espermatogônias-tronco nestas espécies.

## **8. FIGURAS**

Estádios do ciclo do epitélio seminífero caracterizados de acordo com o método do sistema acrossômico e frequência relativa dos mesmos em cavalos

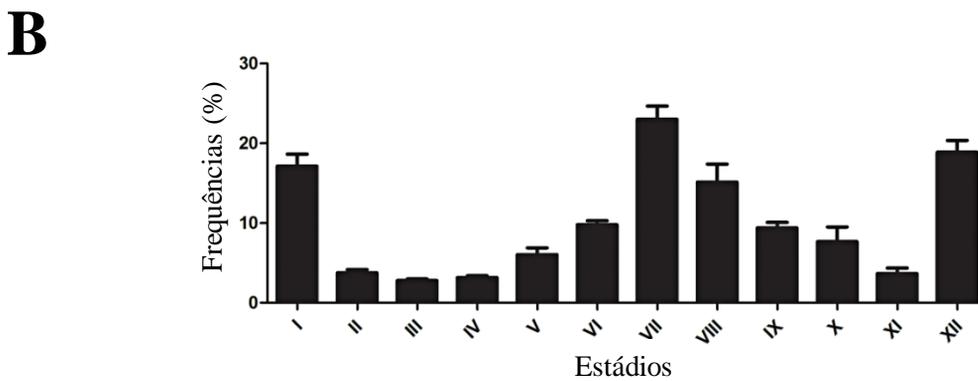
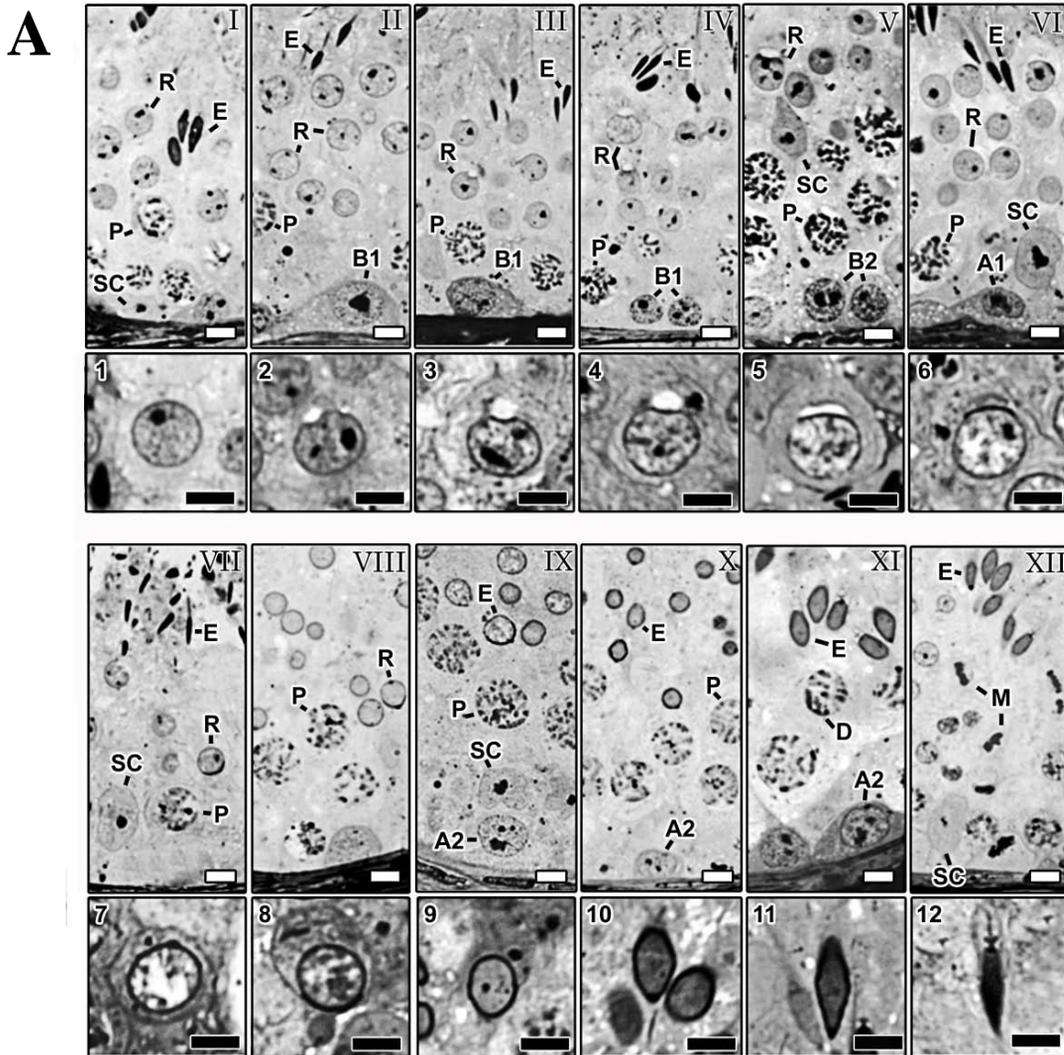


Figura 1. Estádios I a XII do ciclo do epitélio seminífero caracterizados de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico (A), bem como suas respectivas frequências (B) em cavalos. A) Os seguintes símbolos foram utilizados para designar tipos específicos de células germinativas: A1, espermatogônias do tipo A<sub>1</sub>; A2, espermatogônias do tipo A<sub>2</sub>; B1, espermatogônias do tipo B<sub>1</sub>; B2, espermatogônias do tipo B<sub>2</sub>; P, espermatócitos primários em paquíteno; D, espermatócitos primários em diplóteno; M, figuras de meiose; R, espermátides arredondadas; E, espermátides em alongamento/alongadas; e SC, células de Sertoli. Os algarismos arábicos (1-12) no destaque da figura (inserts), indicam cada fase do desenvolvimento do acrossoma nas espermátide. B) Observe que os estádios I, VII e XII apresentaram as maiores frequências, enquanto o oposto foi observado para os estádios II, III, IV e XI. Figura A, barras = 5 µm.

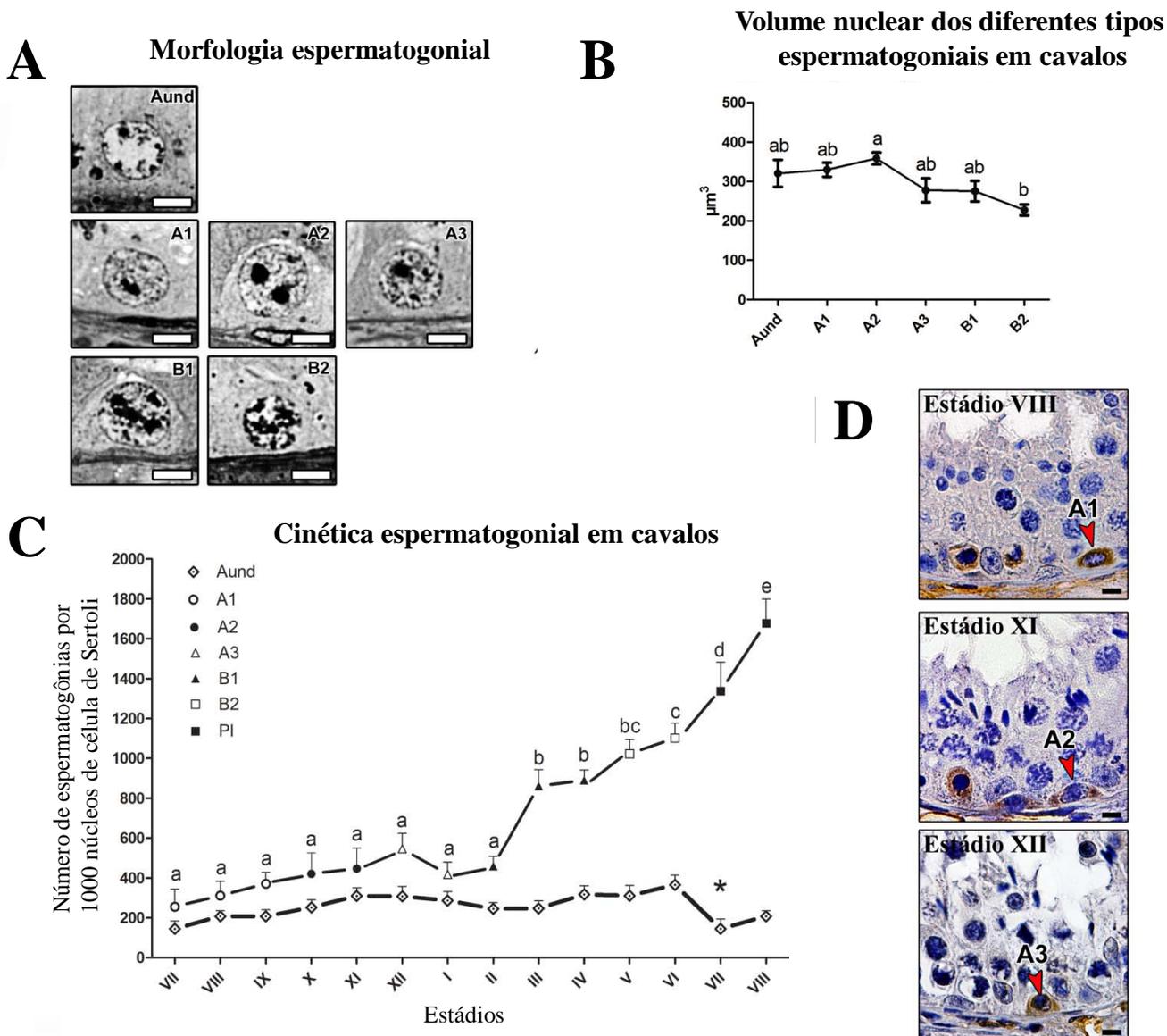


Figura 2. Caracterização morfológica dos diferentes tipos espermatogoniais e sua cinética nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero de cavalos. A) Fotomicrografias de alta resolução das células espermatogoniais: espermatogônias indiferenciadas ( $A_{und}$ ) e diferenciadas (tipo  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $B_1$  e  $B_2$ ), evidenciando o tamanho nuclear e os detalhes que permitiram distinguir morfológicamente estes tipos celulares. B) Volume nuclear dos diferentes tipos espermatogoniais caracterizados no cavalo, mostrando que espermatogônias  $A_2$  apresentam o maior volume nuclear, particularmente se comparado a espermatogônias do tipo  $B_2$ . C) Número (cinética) de células espermatogoniais indiferenciadas e diferenciada e espermatócitos em preleptóteno (PI) por 1000 núcleos de células de Sertoli. Observe que, exceto nos estádios I e II, os valores obtidos para as espermatogônias diferenciadas aumentou gradualmente, enquanto o número de  $A_{und}$  permaneceu relativamente estável atingindo o valor mais baixo no estádio VII. D) Imunolocalização de caspase-3 ativa nas espermatogônias do tipo A diferenciadas ( $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ ). Figura A e D, barras = 5  $\mu$ m.

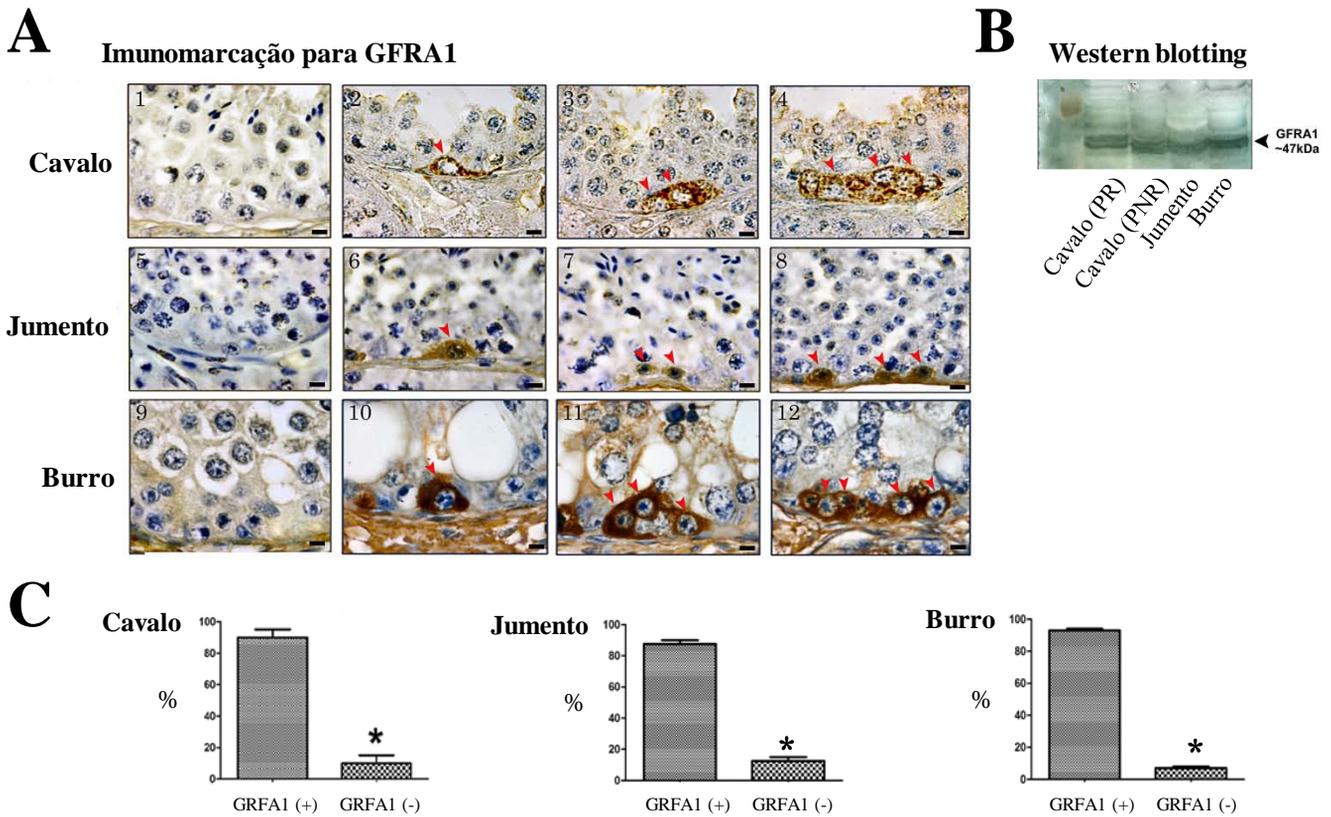
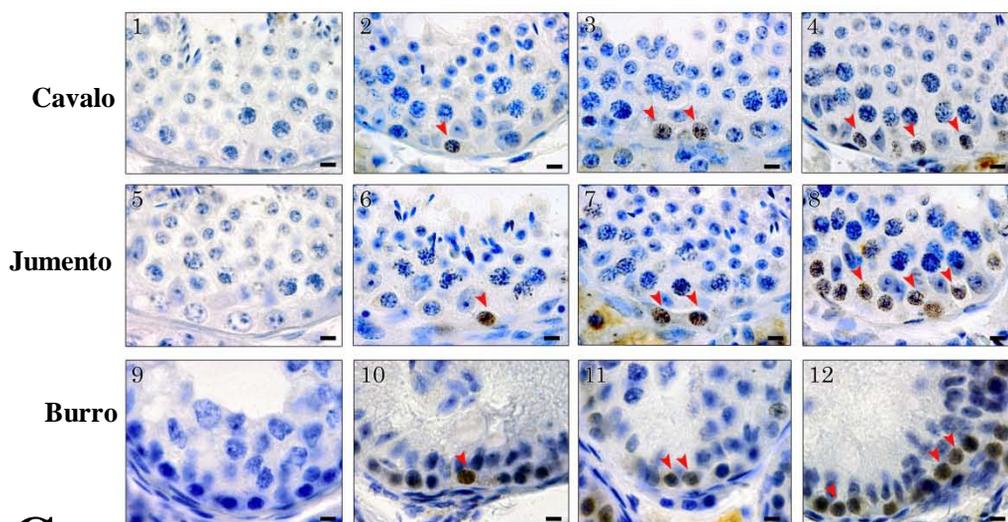
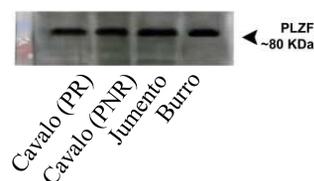


Figura 3: Detecção do receptor GFRA1 através de imunohistoquímica nos testículos de equídeos. A) Conforme pode ser observado, a expressão deste marcador foi limitada ao citoplasma das espermatogônias  $A_{und}$  (cabeças de seta) e este padrão foi semelhante para cavalo (A2-4), jumento (A6-8) e burro (A10-12). A1, A5 e A9 representam os controles negativos. B) Ensaio de *Western blotting* confirmaram a expressão da proteína GFRA1 (~47KDa) nos testículos de cavalos [durante o período reprodutivo (PR) e não-reprodutivo (PNR)], jumentos e burros. C) Percentual de espermatogônias  $A_{und}$  GFRA1 positivas nos testículos de cavalos, jumentos e burros, mostrando que cerca de 90% destas células expressam este receptor de membrana (\*,  $p < 0,05$ ). Figura A, barras =  $10\mu m$ .

## A Imunomarcção para PLZF



## B Western blotting



## C

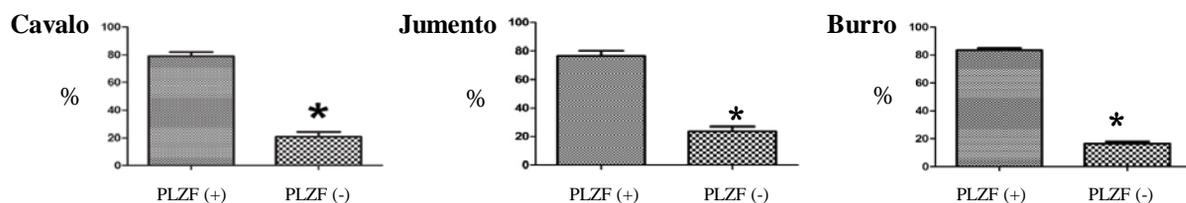


Figura 4. Detecção do fator de transcrição PLZF através de imunohistoquímica nos testículos de equídeos. A) Conforme pode ser observado, a expressão deste marcador está presente no núcleo de espermatogônias A<sub>und</sub> (cabeças de setas) e este padrão foi semelhante para as três espécies de equídeos investigados (cavalos, A2-4; jumentos, A6-8; e burros, A10-12). Os controles negativos são mostrados nas figuras A1, A5 e A9. B) A expressão da proteína PLZF (~80KDa) foi confirmada através de *immunoblotting* nos testículos de cavalos [durante o período reprodutivo (PR) e não-reprodutivo (PNR)], jumentos e burros. C) No testículo de cavalos, jumentos e burros, cerca de 80% (\*, p < 0,05) das espermatogônias A<sub>und</sub> apresentam positividade para este fator de transcrição. Figura A, barra = 10µm.

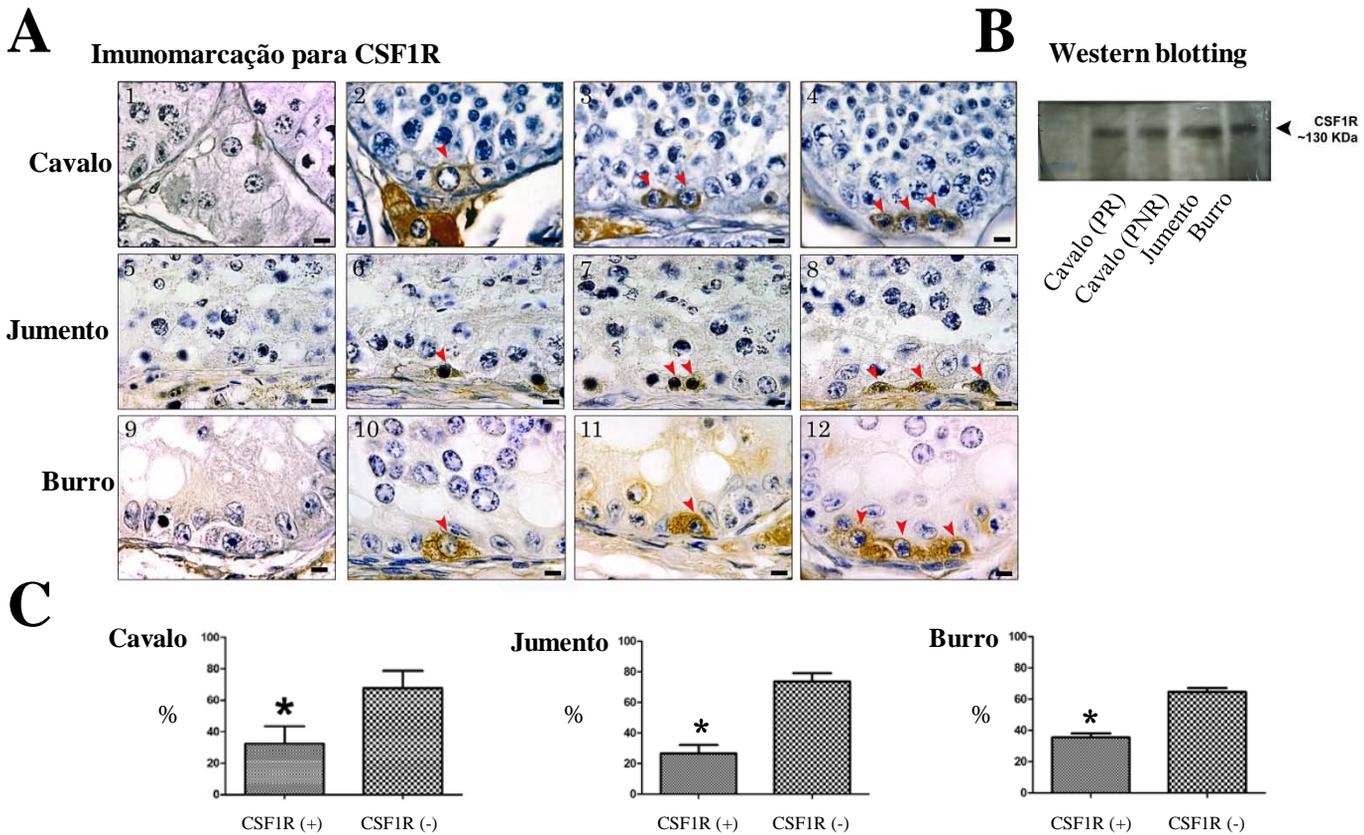


Figura 5. Detecção do receptor CSF1R através de imunohistoquímica nos testículos de equídeos. A) Conforme pode ser observado, a expressão deste marcador é limitada ao citoplasma de espermatogônias A<sub>und</sub> (cabeças de setas) e este padrão foi semelhante para cavalo (A2-4), jumento (A6-8) e burro (A10-12). Figuras A1, A5 e A9 representam os controles negativos. B) A expressão da proteína CSF1R (~130KDa) foi confirmada através de immunoblotting nos testículos de cavalos [durante o período reprodutivo (PR) e não-reprodutivo (PNR)], jumentos e burros. C) No testículo de cavalo, jumento e burro, cerca de 35% (\*, p <0,05) das espermatogônias A<sub>und</sub> apresentam positividade para este receptor de membrana. Figura A, barra = 10µm.

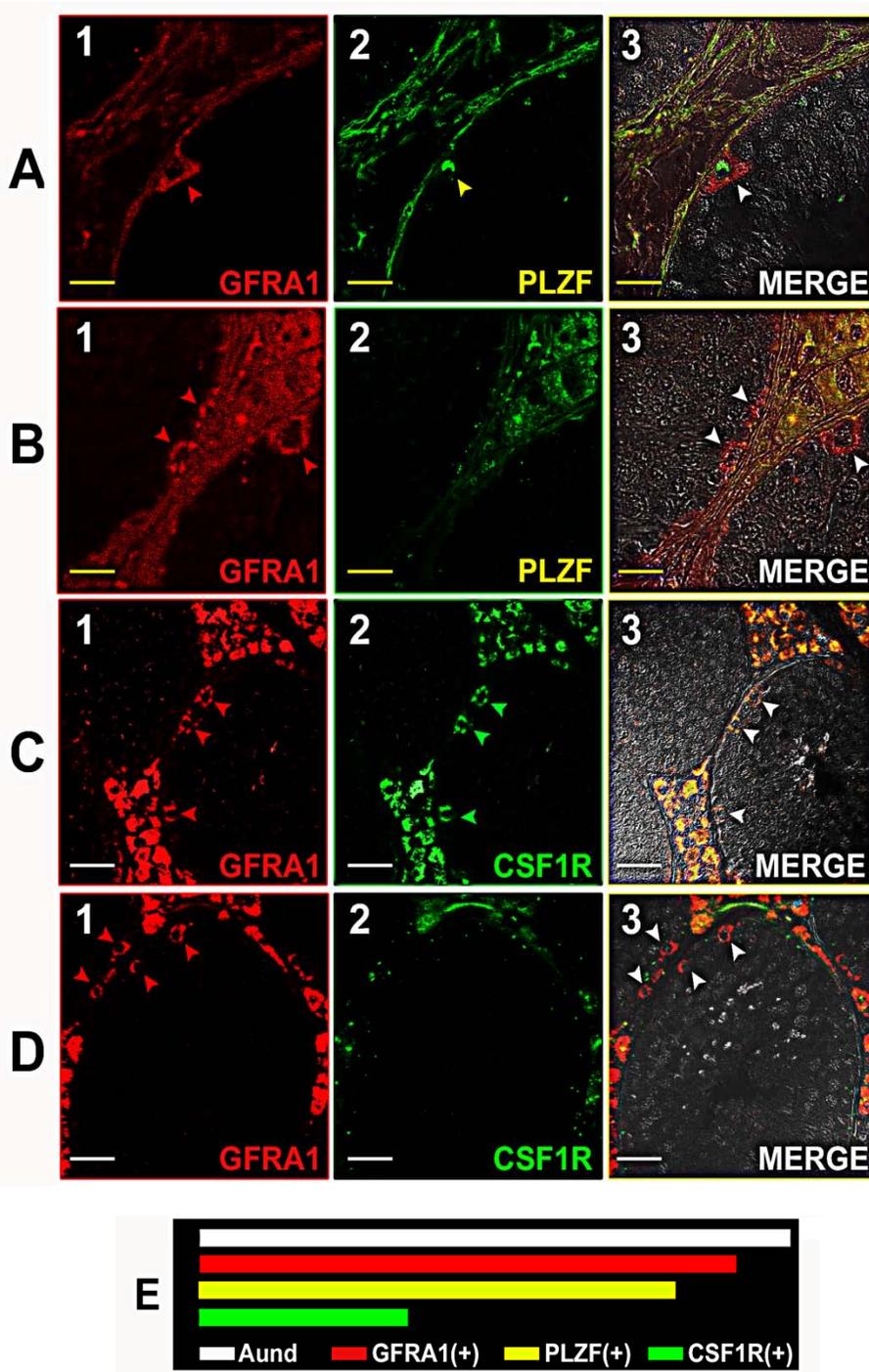


Figura 6. Avaliação qualitativa da co-localização dos três diferentes marcadores espermatogoniais (GFRA1, CSF1R e PLZF) caracterizados para cavalos. Considerando-se a co-expressão de GFRA1 e PLZF o seguinte padrão foi observado: a) células GFRA1<sup>+</sup> (A1; cabeças de setas vermelhas) expressando PLZF (A2; cabeças de setas amarelas), conforme evidenciado na figura resultante da co-localização (A3; cabeças de setas brancas); B) células GFRA1<sup>+</sup> (B1; cabeças de setas vermelhas) que não expressam PLZF (B2), conforme mostrado na figura resultante da co-localização (B3; cabeças de setas brancas). Em relação à co-expressão de GFRA1 e CSF1R o seguinte padrão de marcação foi observado: C) células GFRA1<sup>+</sup> (C1; cabeças de setas vermelhas) expressando CSF1R (C2; cabeças de setas verdes), conforme mostrado na figura resultante da co-localização (C3; cabeças de setas brancas); D) células GFRA1<sup>+</sup> (D1; cabeças de setas vermelhas) que não expressam CSF1R (D2; cabeças de setas brancas na figura de co-localização D3). E) Ilustração resumindo os dados quantitativos obtidos na contagem de espermatogônias Aund de cavalos positivas para GFRA1, PLZF e CSF1R, sugerindo que estas três proteínas são diferencialmente expressas nesta população celular. Barra amarela = 20  $\mu$ m; barra branca = 30  $\mu$ m.

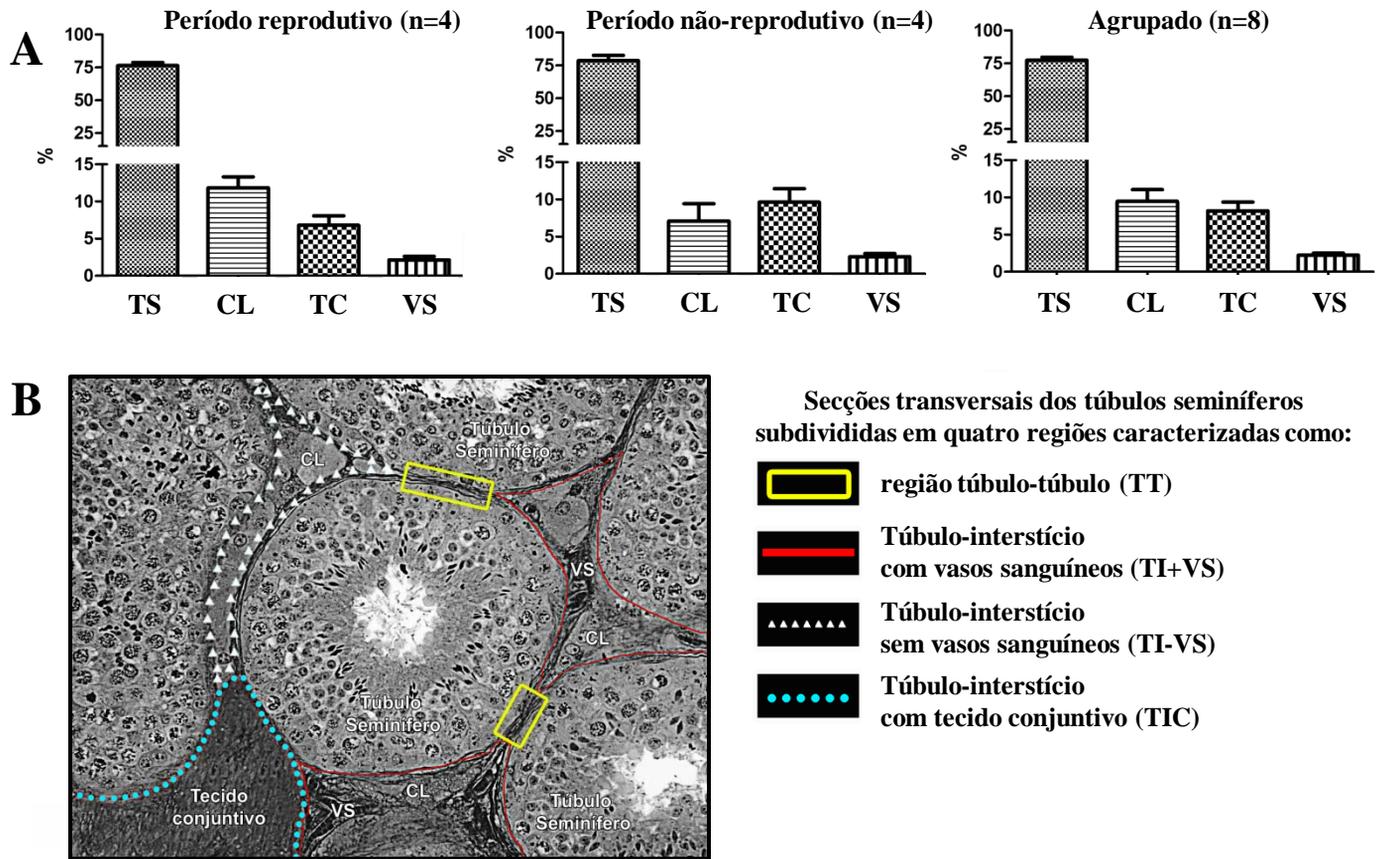


Figura 7. Análise morfométrica dos testículos de cavalos durante o período reprodutivo e não-reprodutivo, e subdivisões em secções transversais dos túbulos seminíferos de acordo com suas áreas de contato, conforme mostrado no lado direito da figura B. A) Embora a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (TS) não tenha sido alterada durante os dois períodos avaliados, as células de Leydig (CL) e o tecido conjuntivo (TC) foram os componentes prevalentes no compartimento intertubular durante a estação reprodutiva e não-reprodutiva, respectivamente. B) De acordo com a prevalência dos componentes testiculares acima mencionados, as secções transversais dos túbulos seminíferos foram subdivididas em 4 diferentes regiões que estão indicadas ao lado da figura B: adjacente a outro túbulo (Túbulo-Túbulo ou TT); adjacente ao interstício sem vasos sanguíneos (Túbulo-Interstício ou TI-VS); adjacente ao interstício contendo vasos sanguíneos (Túbulo-Interstício ou TI+VS); e adjacente ao interstício contendo tecido conjuntivo (Túbulo-tecido conjuntivo ou TIC). VS: vasos sanguíneos. Figura B, barra = 100µm.

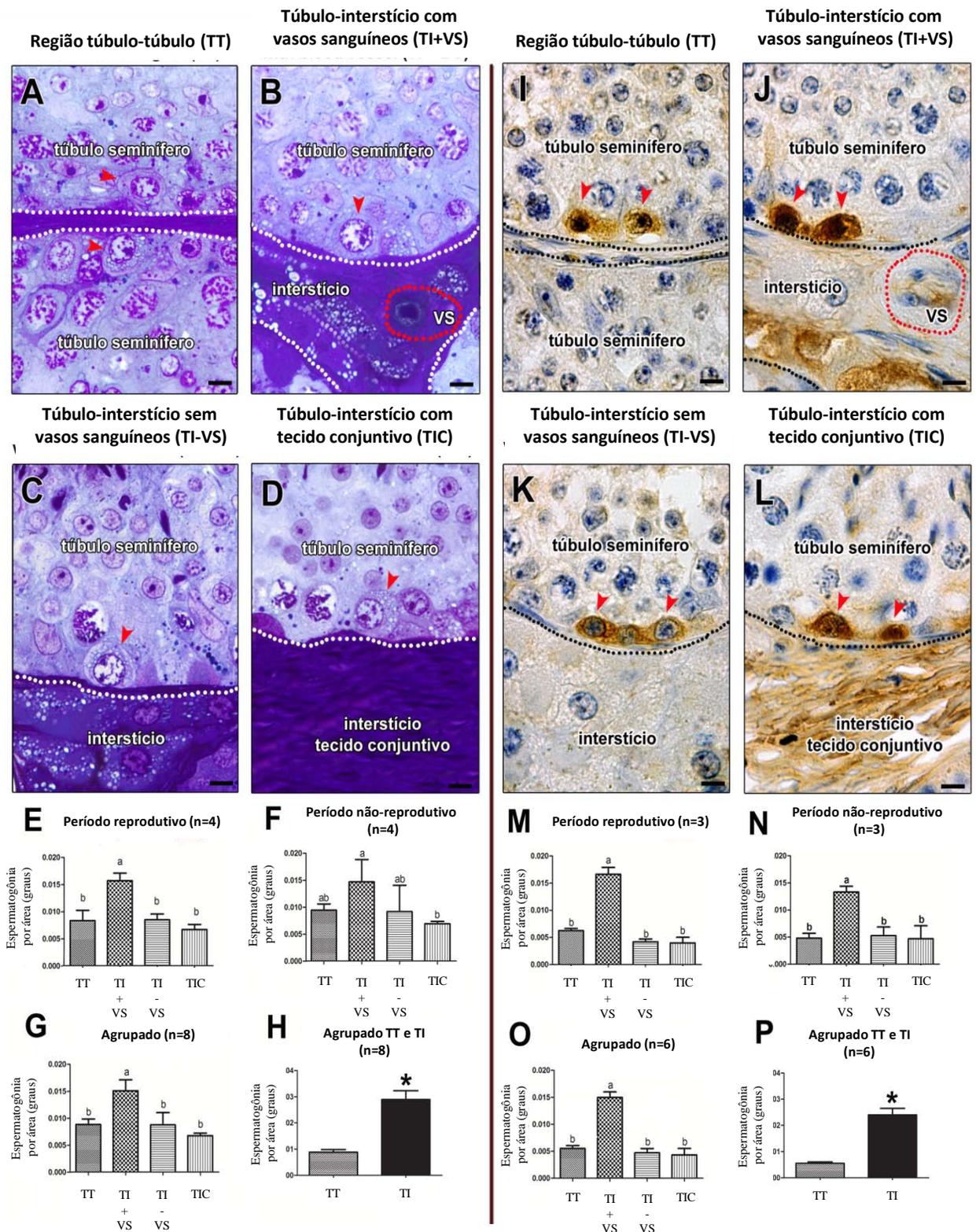


Figura 8. Distribuição e quantificação de espermatogônias Aund de acordo com critérios morfológicos (A-H) e imunohistoquímicos (I-P), em diferentes regiões dos túbulos seminíferos em cavalos. Conforme indicado pelas cabeças de setas vermelhas, utilizando-se ambos os critérios, as células A<sub>und</sub> estavam presentes em todas as quatro diferentes regiões consideradas. No entanto, independentemente da época reprodutiva, essas células foram mais frequentemente encontradas nas áreas próximas ao interstício, especialmente onde observava-se vasos sanguíneos. TT = contato Túbulo-túbulo; TI-VS = contato Túbulo-interstício, sem vasos sanguíneos; TI + VS = contato Túbulo-interstício, com vasos sanguíneos; TIC = contato Túbulo-interstício contendo tecido conjuntivo. Figura A-D e H-K, barra= 10µm.

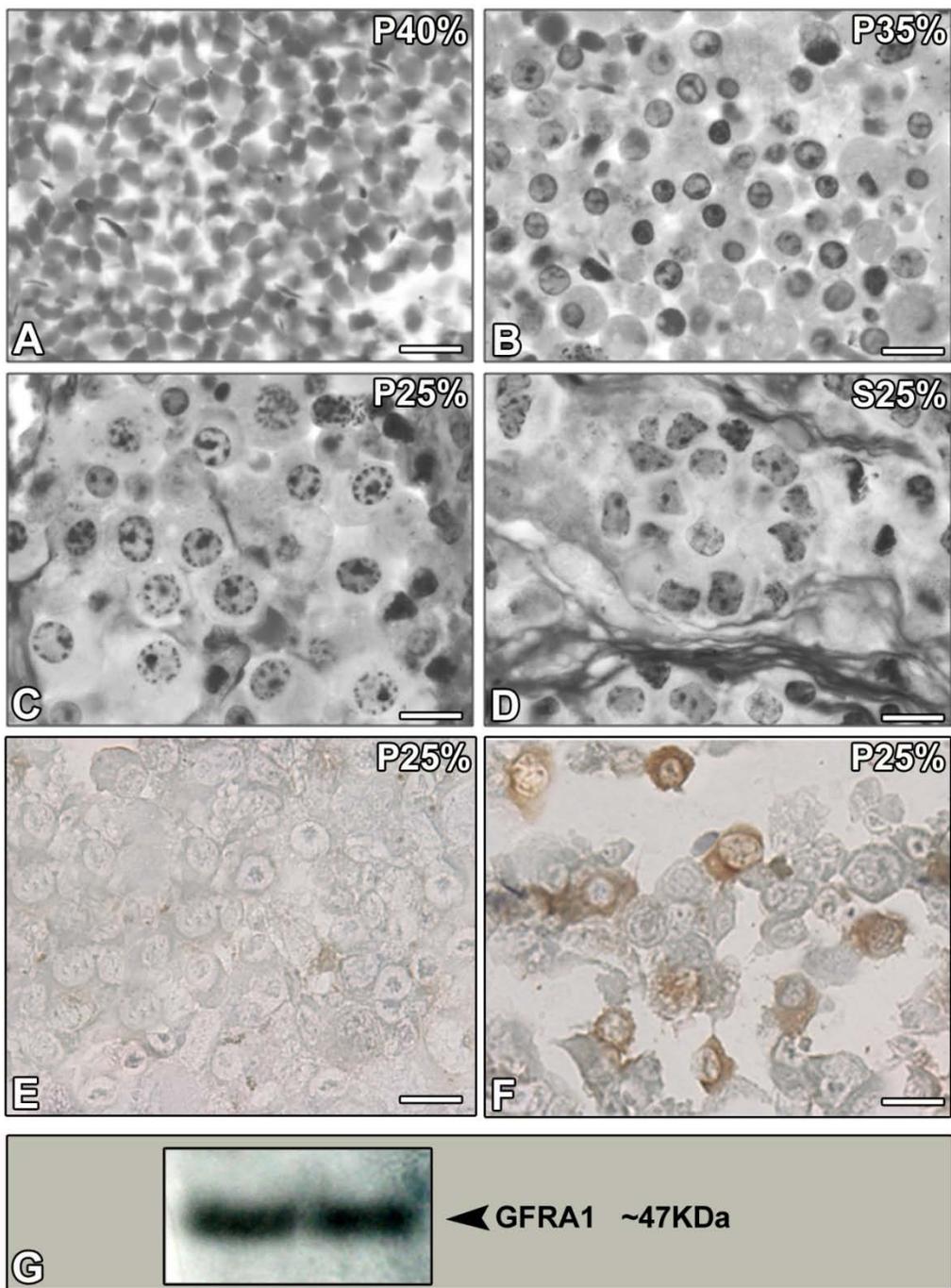


Figura 9. Enriquecimento de espermatogônias-tronco (GFRA1) de equinos em suspensão de células testiculares. (A-D) Separação celular utilizando-se diferentes concentrações da solução de Percoll. Após a centrifugação utilizando solução de Percoll a 40 e 35%, o *pellet* formado continha células pequenas, como hemácias e espermatozóides (A); e espermatídes arredondadas e alongadas (B). Quando foi realizado o Percoll a 25%, pode ser observado no *pellet* grande quantidade de células morfologicamente semelhantes à espermatogônias (C), enquanto o sobrenadante continha grande quantidade de agregados celulares (D). Ao se realizar imunohistoquímica no *pellet* celular formado no Percoll a 25% (E-F) pode-se comprovar a existência de células GFRA1 positivas (F), bem como a presença da proteína nesta suspensão celular (G). (E, controle negativo). Barra=15µm.

## Desenho experimental

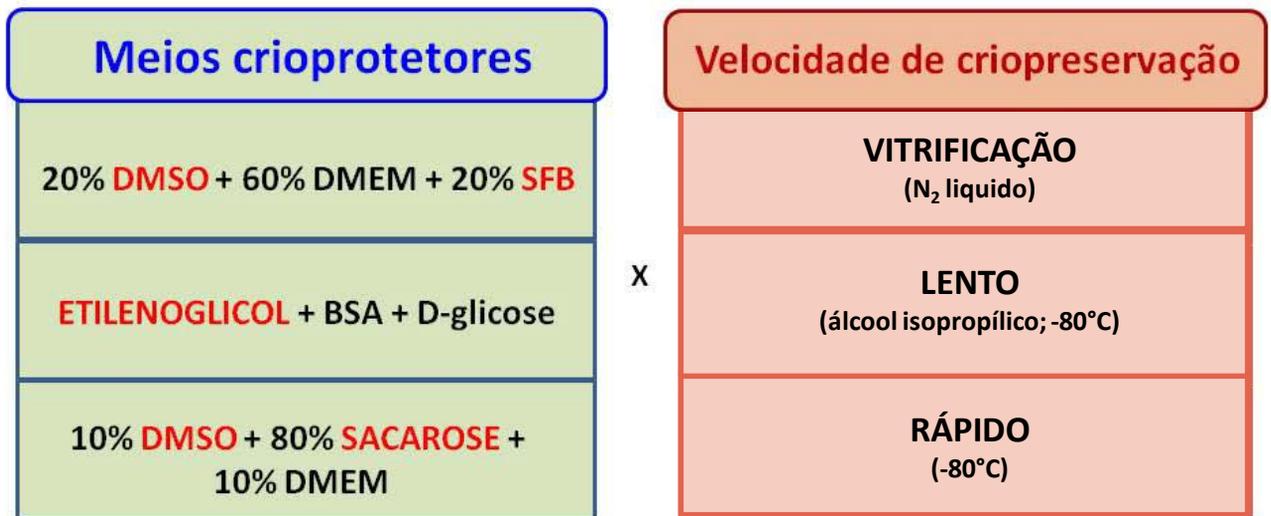


Figura 10. Meios crioprotetores e velocidade de congelamento. No presente estudo nove protocolos de criopreservação de células-tronco espermatogoniais de equino foram avaliados. Desta forma, três diferentes crioprotetores (dimetil sulfóxido + DMEM + SFB; etileno-glicol; dimetil sulfóxido + sacarose), associados com diferentes métodos de resfriamento (vitrificação, congelamento lento e congelamento rápido) foram testados. DMSO = dimetilsulfóxido; DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium; SFB = soro fetal bovino; BSA = albumina sérica bovina; N<sub>2</sub> = nitrogênio.

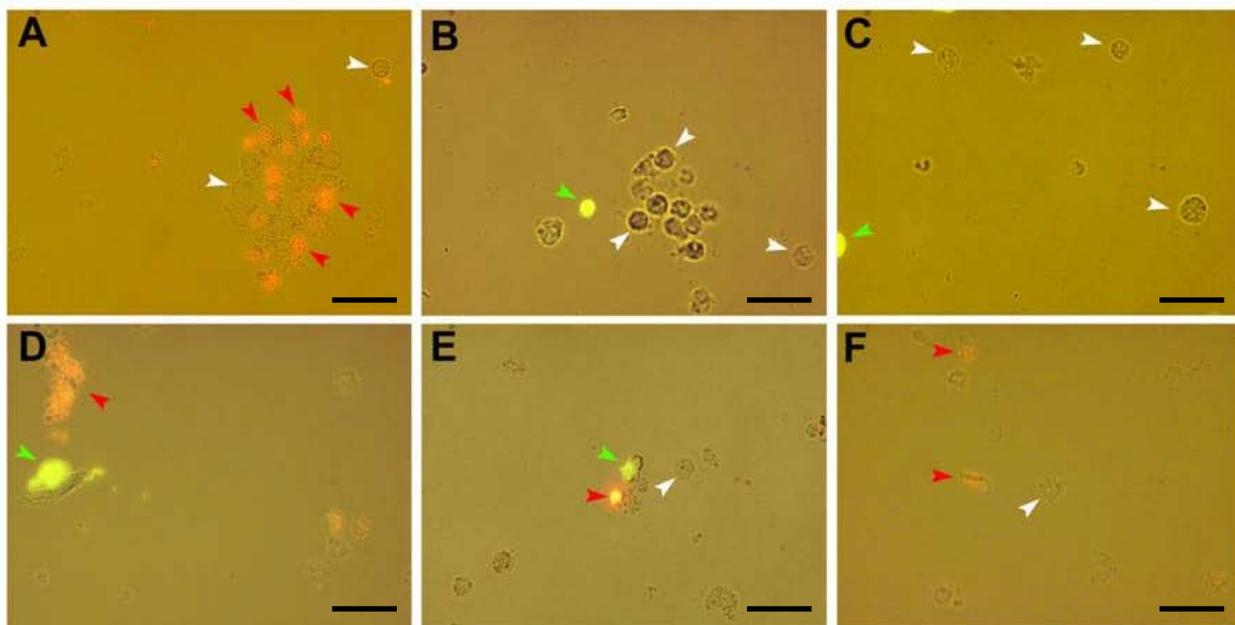


Figura 11. Avaliação da viabilidade de células espermatogoniais de equinos após o descongelamento utilizando-se marcação para Anexina V e iodeto de propídeo (A-F). Células que se encontram em estágios iniciais de apoptose foram intensamente marcadas por anexina V-FITC, que emite fluorescência verde (cabeça de seta verde), como resultado de sua ligação preferencial aos resíduos de fosfatidilserina translocados para a superfície externa da membrana plasmática, no início do processo apoptótico (B-E). Já as células necróticas ou inviáveis foram marcadas por iodeto de propídeo, que emite fluorescência vermelha (cabeça de setas vermelhas) (A, D, E, F). As células sadias ou viáveis não encontram-se marcadas (cabeça de setas brancas) (A-C, E, F). Barras = 30  $\mu$ m.

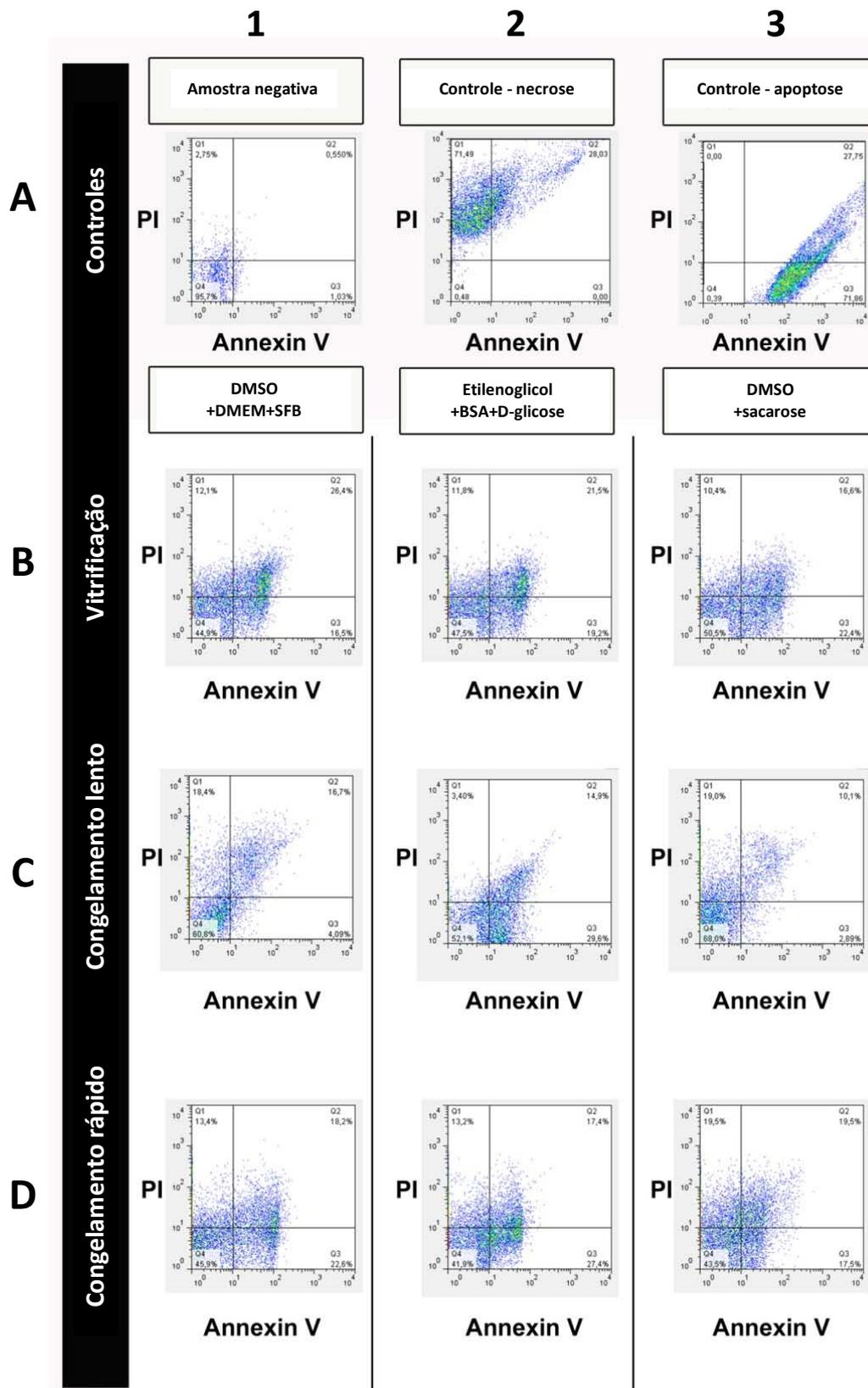


Figura 12. Avaliação da proporção de células vivas e mortas após o descongelamento. As células marcadas com Anexina V-FITC (Annexin V) conjugada e iodeto de propídeo (PI) foram submetidas a análises de citometria de fluxo (FACScan, BD Pharmingen). Os gráficos acima foram obtidos para os grupos controles (A1, A2, A3) e para os grupos experimentais (B, C, D) usando-se o programa “Flow Jo” (Flow Cytometry Analysis Software). Conforme pode ser observado, os melhores resultados, ou seja, o maior percentual de células não marcadas foram obtidos utilizando-se o congelamento lento (C1, C2, C3).

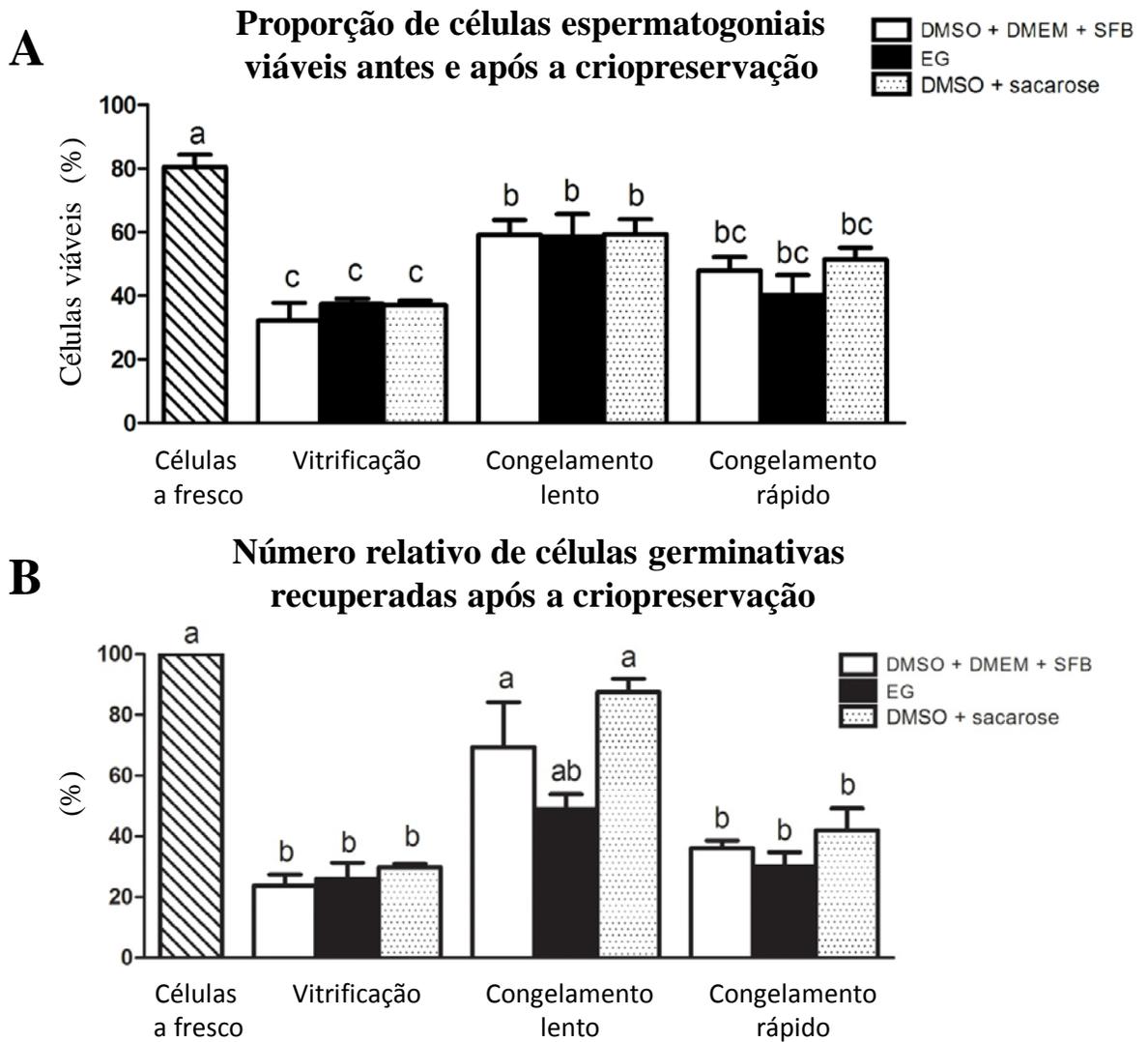


Figura 13. Avaliação da proporção e número de células viáveis após o descongelamento. Baseado na taxa de espermatozônias viáveis antes e após o congelamento (A), bem como no número de células recuperadas após a criopreservação (B). Os resultados encontrados demonstram que o processo lento associado com os crioprotetores contendo DMSO destacam-se como os melhores protocolos para a criopreservação de espermatozônias-tronco em equinos.

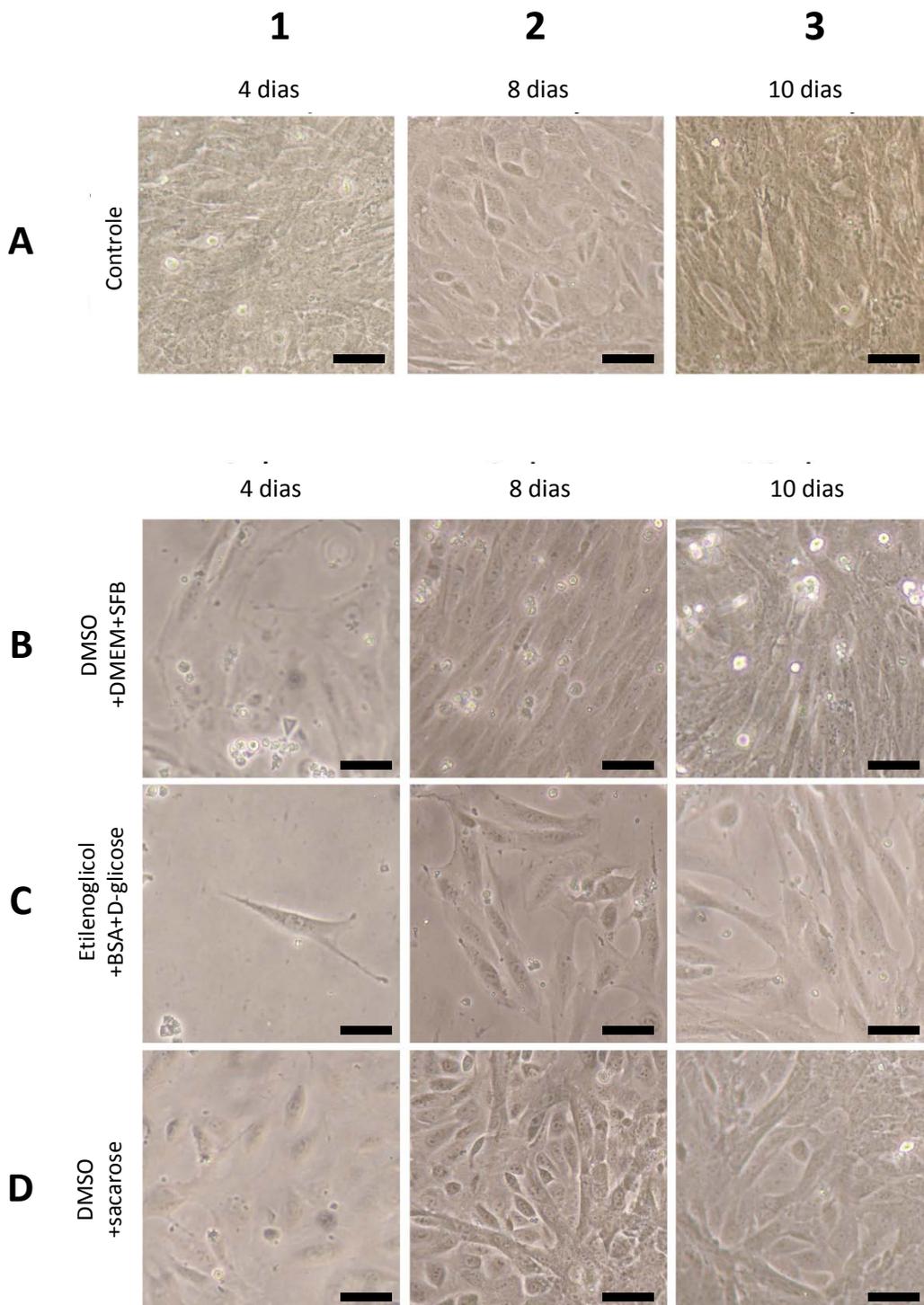


Figura 14. Cultivo de espermatogônias-tronco de equinos após a criopreservação. Conforme pode ser observado, as células não criopreservadas atingiram alta confluência já no 4º dia de cultivo, aumentando gradativamente no oitavo e décimo dia (A1, A2 e A3). Células criopreservadas utilizando-se DMSO como crioprotetor associado ao congelamento lento (B e D) também apresentaram alta confluência. Apesar da menor confluência, células viáveis foram observadas após a criopreservação utilizando-se etilenoglicol associado ao congelamento lento (C). Barra = 25µm.

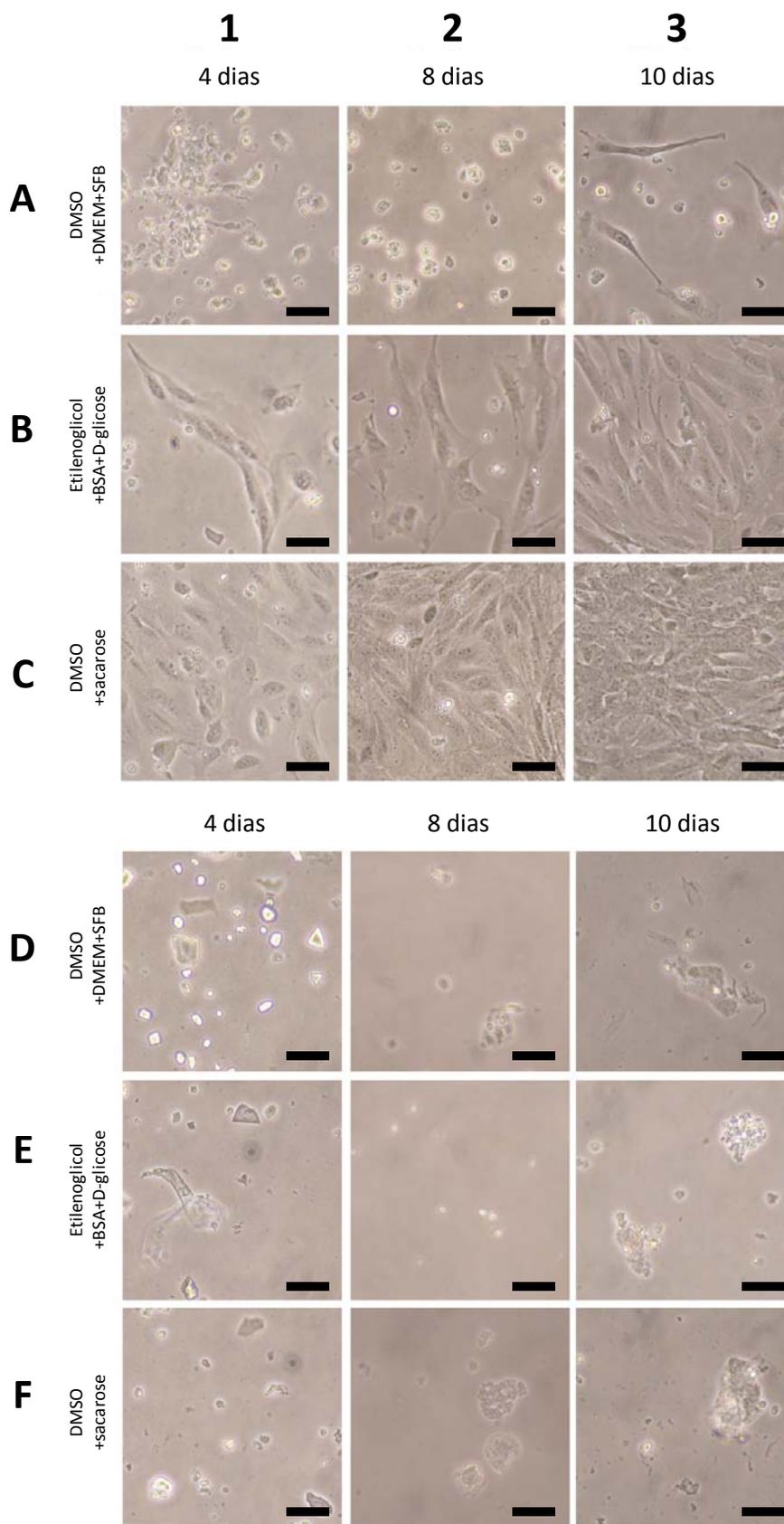


Figura 15. Cultivo de espermatogônias-tronco de equinos após criopreservação. Conforme pode ser observado, células criopreservadas utilizando-se os protocolos de congelamento rápido (A, B, C) e vitrificação (D, E, F) apresentaram menor confluência e viabilidade celular, respectivamente. No congelamento rápido, o criomeio contendo DMSO e alta concentração de sacarose (C) resultou em células viáveis que atingiram maior confluência já aos 4 dias de cultivo. Em contrapartida, nenhum dos criomeios foram eficientes para se manter a viabilidade celular quando o processo de vitrificação foi utilizado (D, E, F). Barra = 25µm.

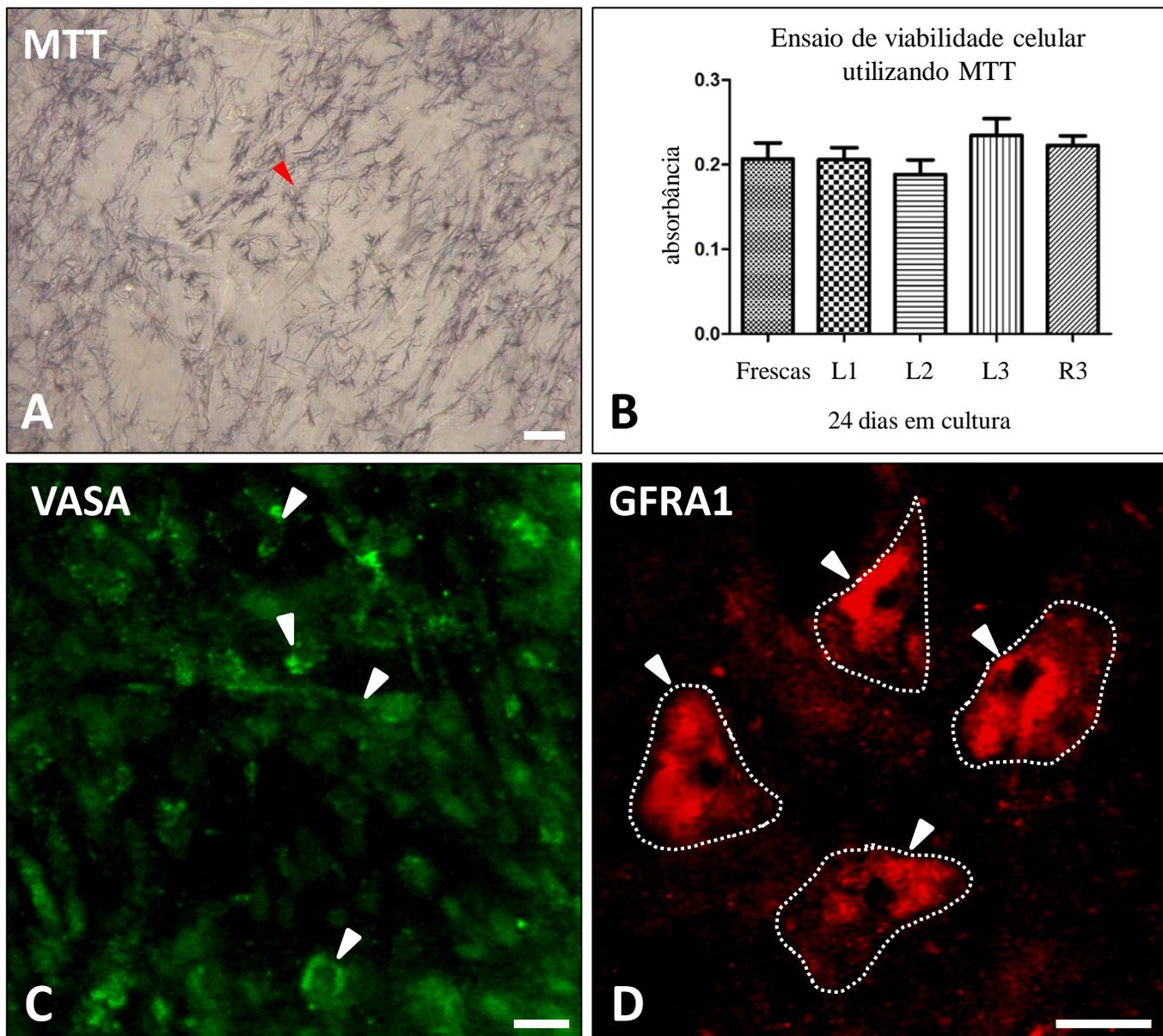


Figura 16. Ensaio de viabilidade celular e imunomarcaco das espermatogônias-tronco cultivadas após o descongelamento. A presença de células germinativas e espermatogônias-tronco viáveis vinte e quatro dias após o descongelamento foi demonstrada pela alta precipitao dos cristais de formazan (cabeça de seta vermelha em A) e alta absorbância (B; valores semelhantes às células não criopreservadas), indicando maior capacidade redutora celular. Além disso, a deteco da expressão de marcadores como a proteína VASA (C; cabeça de setas brancas) e GFRA1 (D; cabeça de setas brancas) confirmam que as células criopreservadas e mantidas em cultura são predominantemente células germinativas indiferenciadas. Barra = 10µm.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. Referências bibliográficas

- AECKERLE N, EILDERMANN K, DRUMMER C, EHMCKE J, SCHWEYER S, LERCHL A, BERGMANN M, KLIESCH S, GROMOLL J, SCHLATT S, BEHR R. The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Mol Hum Reprod*. 2012. *In press*.
- ALBERT S, WISTUBA J, EILDERMANN K, EHMCKE J, SCHLATT S, GROMOLL J, KOSSACK N. Comparative Marker Analysis after Isolation and Culture of Testicular Cells from the Immature Marmoset. *Cells Tissues Organs*. 2012. *In press*.
- ARREGUI L, RATHI R, MEGEE SO, HONARAMOOZ A, GOMENDIO M, ROLDAN ER, DOBRINSKI I. Xenografting of sheep testis tissue and isolated cells as a model for preservation of genetic material from endangered ungulates. *Reproduction*. 2008. 136(1): 85-93.
- AUHAREK SA, DE FRANÇA LR. Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat*. 2010. 216(5): 577-588.
- AVARBOCK MR, BRINSTER CJ, BRINSTER RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med*. 1996. 2(6): 693-696.
- BALOH RH, TANSEY MG, JOHNSON EM JR, MILBRANDT J. Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists. *J Biol Chem*. 2000. 275(5): 3412-3420.
- BENDEL-STENZEL M, ANDERSON R, HEASMAN J, WYLIE C. The origin and migration of primordial cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol*. 1998. 9(4): 393-400.
- BERNDTSON WE, SQUIRES EL, THOMPSON DL JR. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology*. 1983. 20(4): 449-457.
- BORJIGIN U, DAVEY R, HUTTON K, HERRID M. Expression of promyelocytic leukaemia zinc-finger in ovine testis and its application in evaluating the enrichment efficiency of differential plating. *Reprod Fertil Dev*. 2010. 22(5): 733-742.
- BRAYTON CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet*. 1986. 76(1): 61-90.
- BRINSTER RL, AVARBOCK MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91(24): 11303-11307.
- BRINSTER RL, ZIMMERMANN JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91(24): 11298-11302.

- 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 Genet.* 2004. 36(6): 647-652.
- CAIRES K, BROADY J, MCLEAN D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol.* 2010. 205(2): 133-145.
- CAMPOS-JUNIOR PH, COSTA GM, LACERDA SM, REZENDE-NETO JV, DE PAULA AM, HOFMANN MC, DE FRANÇA LR. The Spermatogonial Stem Cell Niche in the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). *Biol Reprod.* 2012. 86(5): 1-10.
- 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.* 2009. 116(1-2): 139-154
- CHIARINI-GARCIA H, HORNICK JR, GRISWOLD MD, RUSSELL LD. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod.* 2001. 65(4): 1179-1185.
- CHIARINI-GARCIA H, RAYMER AM, RUSSELL LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction.* 2003. 126(5): 669-680.
- 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.* 2011. 10(2): 23-31.
- 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.* 2010. 31(2): 221-230.
- 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.* 2004. 36(6): 653-659.
- DE ROOIJ DG, GRISWOLD MD. Questions about Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *J Androl.* 2012. *In press.*
- DE ROOIJ DG, GROOTEGOED JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1998. 10(6): 694-701.
- DE ROOIJ DG, RUSSELL LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 2000. 21(6): 776-798.
- DE ROOIJ DG, VAN PELT AM. Spermatogonial stem cell biology. *Annu Rev Biomed Sci.* 2003. 5: 105-114.
- DE ROOIJ DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech.* 2009. 72(8): 580-585.

- DETTIN L, RAVINDRANATH N, HOFMANN MC, DYM M. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biol Reprod.* 2003. 69(5): 1565-1571.
- 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.* 2009. 32(5): 486-497.
- DOBRINSKI I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci.* 2005. 89(1-4): 137-145.
- EHMCKE J, SCHLATT S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction.* 2006. 132(5): 673-680.
- FERRER MS, LUTJEMEIER BJ, KOOPMAN T, PIERUCCI-ALVES F, WEISS ML. Xenogeneic transplantation of equine testicular cells into seminiferous tubules of immunocompetent rats. *Theriogenology.* 2011. 75(7): 1258-1264.
- FILIPPONI D, HOBBS RM, OTTOLENGHI S, ROSSI P, JANNINI EA, PANDOLFI PP, DOLCI S. Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol Cell Biol.* 2007. 27(19): 6770-6781.
- 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.
- GASSEI K, EHMCKE J, DHIR R, SCHLATT S. Magnetic activated cell sorting allows isolation of spermatogonia from adult primate testes and reveals distinct GFRA1-positive subpopulations in men. *J Med Primatol.* 2010. 39(2): 83-91.
- GRASSO M, FUSO A, DOVERE L, DE ROOIJ DG, STEFANINI M, BOITANI C, VICINI E. Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis. *Reproduction.* 2012. 143(3): 325-332.
- 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. 27(12): 3043-3052.
- HA TY, AHN MJ, LEE YD, YANG JH, KIM HS, SHIN TK. Histochemical detection of glycoconjugates in the male reproductive system of the horse. *J Vet Sci.* 2003. 4(1): 21-28.
- HAEGEBARTH A, CLEVERS H. Wnt signaling, *Igr5*, and stem cells in the intestine and skin. *Am J Pathol.* 2009. 174(3): 715-721.
- HAMRA FK, SCHULTZ N, CHAPMAN KM, GRELLHESL DM, CRONKHITE JT, HAMMER RE, GARBERS DL. Defining the spermatogonial stem cell. *Dev Biol.* 2004. 269(2): 393-410.

- HE Z, KOKKINAKI M, JIANG J, ZENG W, DOBRINSKI I, DYM M. Isolation of human male germ-line stem cells using enzymatic digestion and magnetic-activated cell sorting. *Methods Mol Biol.* 2012. 825: 45-57.
- HERMANN BP, SUKHWANI M, HANSEL MC, ORWIG KE. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction.* 2010. 139(3): 479-493.
- HERMANN BP, SUKHWANI M, LIN CC, SHENG Y, TOMKO J, RODRIGUEZ M, SHUTTLEWORTH JJ, MCFARLAND D, HOBBS RM, PANDOLFI PP, SCHATTEN GP, ORWIG KE. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells.* 2007. 25(9): 2330-2338.
- HERMANN BP, SUKHWANI M, SIMORANGKIR DR, CHU T, PLANT TM, ORWIG KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Hum Reprod.* 2009. 24(7):1704-1716.
- HESS RA, FRANCA LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: CHENG, CY (Ed). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* N.Y.: Landes Bioscience. 2007.
- HOBBS RM, SEANDEL M, FALCIATORI I, RAFII S, PANDOLFI PP. Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell.* 2010. 142(3): 468-479.
- HOFMANN MC, BRAYDICH-STOLLE L, DYM M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol.* 2005. 279(1): 114-124.
- HONARAMOOZ A, MEGEE SO, RATHI R, DOBRINSKI I. Building a testis: formation of functional testis tissue after transplantation of isolated porcine (*Sus scrofa*) testis cells. *Biol Reprod.* 2007. 76(1): 43-47.
- HONARAMOOZ A, SCHLATT S, ORWIG K, KIM NH. Recent advances in reproductive technologies. *Vet Med Int.* 2011. pii: 915031.
- HONARAMOOZ A, YANG Y. Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals. *Vet Med Int.* 2011. pii: 657860.
- IZADYAR F, MATTHIJS-RIJSENBILT JJ, DEN OUDEN K, CREEMERS LB, WOELDERS H, DE ROOIJ DG. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J Androl.* 2002. 23(4): 537-545.
- JING S, WEN D, YU Y, HOLST PL, LUO Y, FANG M, TAMIR R, ANTONIO L, HU Z, CUPPLES R, LOUIS JC, HU S, ALTROCK BW, FOX GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 1996. 85(7): 1113-1124.
- JOHNSON L, HARDY VB, MARTIN MT. Staging equine seminiferous tubules by Nomarski optics in unstained histologic sections and in tubules mounted in toto to reveal the spermatogenic wave. *Anat Rec.* 1990a. 227(2): 167-174.

- JOHNSON L, KATTAN-SAID AF, HARDY VB, SCRUTCHFIELD WL. Isolation and staging of horse seminiferous tubules by transillumination. *J Reprod Fertil.* 1990b. 89(2): 689-696.
- JOHNSON L, THOMPSON DL JR. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *J Reprod Fertil.* 1987. 81(1): 227-232.
- JOHNSON L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. *Biol Reprod.* 1985. 32(5): 1181-1190.
- JOHNSON L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol Reprod.* 1991. 44(2): 284-291.
- JOHNSTON DS, OLIVAS E, DICANDELO 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. 85(4): 763-769.
- KANATSU-SHINOHARA M, OGONUKI N, INOUE K, OGURA A, TOYOKUNI S, SHINOHARA T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod.* 2003. 18(12): 2660-2667.
- KITA K, WATANABE T, OHSAKA K, HAYASHI H, KUBOTA Y, NAGASHIMA Y, AOKI I, TANIGUCHI H, NOCE T, INOUE K, MIKI H, OGONUKI N, TANAKA H, OGURA A, OGAWA T. Production of functional spermatids from mouse germline stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules. *Biol Reprod.* 2007. 76(2): 211-217.
- KLISCH K, CONTRERAS DA, SUN X, BREHM R, BERGMANN M, ALBERIO R. The Sda/GM2-glycan is a carbohydrate marker of porcine primordial germ cells and of a subpopulation of spermatogonia in cattle, pigs, horses and llama. *Reproduction.* 2011 142(5): 667-674.
- 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.* 2009. 80(4): 707-717.
- KOLASA A, MISIAKIEWICZ K, MARCHLEWICZ M, WISZNIEWSKA B. The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod Biol.* 2012. 12(1): 5-23.
- KUIJK EW, COLENBRANDER B, ROELEN BA. The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. *Reproduction.* 2009. 138(4): 721-731.
- LACERDA SM, BATLOUNI SR, COSTA GM, SEGATELLI TM, QUIRINO BR, QUEIROZ BM, KALAPOTHAKIS E, FRANÇA LR. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PLoS One.* 2010. 5(5): e10740.

- LEIBO SP, POOL TB. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertil Steril*. 2011. 96(2): 269-276.
- LI L, CLEVERS H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010. 327(5965): 542-545.
- MAKI CB, PACCHIAROTTI J, RAMOS T, PASCUAL M, PHAM J, KINJO J, ANORVE S, IZADYAR F. Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes. *Hum Reprod*. 2009. 24(6): 1480-1491.
- MAZUR P. A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology*. 2010. 60(1): 4-10.
- 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*. 1992. 233(4): 527-537.
- MIRZAPOUR T, MOVAHEDIN M, TENGKU IBRAHIM TA, HARON AW, NOWROOZI MR. Evaluation of the effects of cryopreservation on viability, proliferation and colony formation of human spermatogonial stem cells in vitro culture. *Andrologia*. 2012. *In press*.
- NAKAGAWA T, SHARMA M, NABESHIMA Y, BRAUN RE, YOSHIDA S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science*. 2010. 328(5974): 62-67.
- NEVES ES, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod*. 2002. 67(1):247-55.
- NEVES ES, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Ultrastructural observation of the mule testis indicates normal function of somatic cells. *Anim. Reprod*. 4: 263-271.
- OATLEY JM, BRINSTER RL. The germline stem cell niche unit in Mammalian testes. *Physiol Rev*. 2012. 92(2): 577-595.
- 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*. 2009. 136(7): 1191-1199.
- OATLEY JM, REEVES JJ, MCLEAN DJ. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. *Biol Reprod*. 2004. 71(3): 942-947.
- ORWIG KE, RYU BY, AVARBOCK MR, BRINSTER R. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal testes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99(18): 11706-11711.
- PAŁASZ A, KAMIŃSKI M. Stem cell niche in the Drosophila ovary and testis; a valuable model of the intercellular signalling relationships. *Adv Med Sci*. 2009. 54(2): 143-149.

- PEÑA FJ, GARCÍA BM, SAMPER JC, APARICIO IM, TAPIA JA, FERRUSOLA CO. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*. 2011. 76(7): 1177-1186.
- PHILLIPS BT, GASSEI K, ORWIG KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010. 365(1546): 1663-1678.
- POWELL RH, BIANCARDI MN, POPE CE, LEIBO SP, WANG G, GÓMEZ MC. 219 Isolation and characterization of domestic cat spermatogonial cells. 2011. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 221-222.
- REDING SC, STEP NOSKI AL, CLONINGER EW, OATLEY JM. THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction*. 2010. 139(5): 893-903.
- ROBERTSON K, MASON I. The GDNF-RET signalling partnership. *Trends Genet*. 1997. 13(1): 1-3.
- ROSS AJ, CAPEL B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab*. 2005. 16(1): 19-25.
- RUSSELL LD, CHIARINI-GARCIA H, KORSMEYER SJ, KNUDSON CM. Bax-Dependent Spermatogonia Apoptosis Is Required for Testicular Development and Spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2002. 66: 950-958.
- RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 1990.
- 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*. 1999. 140(12): 5894-5900.
- SEIDEL GE JR. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006. 65(1): 228-235.
- SHARPE RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E; NEIL, JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. p.1363-1434. 1994.
- SIEME H, HARRISON RA, PETRUNKINA AM. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci*. 2008. 107(3-4): 276-292.
- SILVA RC, COSTA GM, LACERDA SM, BATLOUNI SR, SOARES JM, AVELAR GF, BÖTTGER KB, SILVA SF JR, NOGUEIRA MS, ANDRADE LM, FRANÇA LR. Germ cell transplantation in felids: a potential approach to preserving endangered species. *J Androl*. 2012. 33(2): 264-276.
- SIMON L, EKMAN GC, KOSTEREVA N, ZHANG Z, HESS RA, HOFMANN MC, COOKE PS. Direct transdifferentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers. *Stem Cells*. 2009. 27(7): 1666-1675.

- SIMON L, EKMAN GC, TYAGI G, HESS RA, MURPHY KM, COOKE PS. Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp Cell Res*. 2007. 313(14): 3090-3099.
- SOJKA, E. J.; KIMMICK, S. V. B.; CARISON, G. P. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. *Proceedings American Associated Equine Practit*. 1990. 36: 683-690.
- SPINNLER K, KÖHN FM, SCHWARZER U, MAYERHOFER A. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum Reprod*. 2010 25: 2181-2187.
- STONE RW. Clinical updates on the use of dimethylsulfoxide. *Canine Pract*. 1993. 18: 16-19.
- SWIERSTRA EE, GEBAUER MR, PICKETT BW. Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. *J Reprod Fertil*. 1974. 40: 113–123.
- TEGELENBOSCH RA, DE ROOIJ DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*. 1993. 290: 193–200.
- TREANOR JJ, GOODMAN L, DE SAUVAGE F, STONE DM, POULSEN KT, BECK CD, GRAY C, ARMANINI MP, POLLOCK RA, HEFTI F, PHILLIPS HS, GODDARD A, MOORE MW, BUJ-BELLO A, DAVIES AM, ASAI N, TAKAHASHI M, VANDLEN R, HENDERSON CE, ROSENTHAL A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*. 1996 382: 80-83.
- VERINI-SUPLIZI A, STRADAIOLI G, FAGIOLI O, PARILLO F. Localization of the lectin reactive sites in adult and prepubertal horse testes. *Res Vet Sci*. 2000. 69(2): 113-118.
- VON SCHÖNFELDT V, WISTUBA J, SCHLATT S. Notch-1, c-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. *Cytogenet Genome Res*. 2004. 105: 235-239.
- VOOG J, JONES DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*. 2010. 6(2): 103-115.
- WANG X, DING Q, ZHANG Y, WANG H, MA L, XIE X. Two allogeneic descendents derived from the high-dose busulfan-treated infertile mouse model after freeze-thawed spermatogonial stem cell transplantation. *Fertil Steril*. 2008. 90: 1538-1549.
- WORBY CA, VEGA QC, ZHAO Y, CHAO HH, SEASHOLTZ AF, DIXON JE. Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996. 271(39): 23619-23622.

- WU X, GOODYEAR SM, ABRAMOWITZ LK, BARTOLOMEI MS, TOBIAS JW, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Hum Reprod.* 2012. 27(5): 1249-1259.
- YANG L, PENG R. Unveiling Hair Follicle Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 2010. 6(4): 658-664.
- 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.* 2007. 317(5845): 1722-1726.
- 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.* 2004. 269(2): 447-458.
- YOSHIDA S. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction.* 2012. 144(3): 293-302.
- YUAN Z, HOU R, WU J. Generation of mice by transplantation of an adult spermatogonial cell line after cryopreservation. *Cell Prolif.* 2009. 42(2): 123-131.

## **10. ANEXO – ARTIGO PUBLICADO**

# Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids

Guilherme M. J. Costa<sup>1</sup>, Gleide F. Avelar<sup>1</sup>, José V. Rezende-Neto<sup>1</sup>, Paulo Henrique A. Campos-Junior<sup>1</sup>, Samyra M. S. N. Lacerda<sup>1</sup>, Bruno S. C. Andrade<sup>1</sup>, Ralph Gruppi Thomé<sup>1</sup>, Marie-Claude Hofmann<sup>2</sup>, Luiz R. Franca<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Cellular Biology, Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Unit 1105, Department of Endocrine Neoplasia and Hormonal Disorders, MD Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, Texas, United States of America

## Abstract

Spermatogonial stem cells (SSCs) are the foundation of spermatogenesis and are located in a highly dynamic microenvironment called “niche” that influences all aspects of stem cell function, including homing, self-renewal and differentiation. Several studies have recently identified specific proteins that regulate the fate of SSCs. These studies also aimed at identifying surface markers that would facilitate the isolation of these cells in different vertebrate species. The present study is the first to investigate SSC physiology and niche in stallions and to offer a comparative evaluation of undifferentiated type A spermatogonia (Aund) markers (GFRA1, PLZF and CSF1R) in three different domestic equid species (stallions, donkeys, and mules). Aund were first characterized according to their morphology and expression of the GFRA1 receptor. Our findings strongly suggest that in stallions these cells were preferentially located in the areas facing the interstitium, particularly those nearby blood vessels. This distribution is similar to what has been observed in other vertebrate species. In addition, all three Aund markers were expressed in the equid species evaluated in this study. These markers have been well characterized in other mammalian species, which suggests that the molecular mechanisms that maintain the niche and Aund/SSCs physiology are conserved among mammals. We hope that our findings will help future studies needing isolation and cryopreservation of equids SSCs. In addition, our data will be very useful for studies that aim at preserving the germplasm of valuable animals, and involve germ cell transplantation or xenografts of equids testis fragments/germ cells suspensions.

**Citation:** Costa GMJ, Avelar GF, Rezende-Neto JV, Campos-Junior PHA, Lacerda SMSN, et al. (2012) Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. PLoS ONE 7(8): e44091. doi:10.1371/journal.pone.0044091

**Editor:** Stefan Schlatt, University Hospital of Münster, Germany

**Received:** June 8, 2012; **Accepted:** August 1, 2012; **Published:** August 28, 2012

**Copyright:** © 2012 Costa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by CNPq and FAPEMIG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lrfanca@icb.ufmg.br

## Introduction

Spermatogonial stem cells (SSCs) are the undifferentiated male germ cells committed to the establishment and maintenance of spermatogenesis [1]. These cells are capable of self-renewal (providing a pool of A single or As spermatogonia) and differentiation, leading to the formation of Apaired (Apr), Aaligned (Aal) and differentiating spermatogonia (A1–4, In and B; in rodents) [1–5]. In horses and donkeys, it is already established that Aal spermatogonia differentiate into A1 spermatogonia that produce A2 and A3 spermatogonia, which give rise to type B1 and B2 spermatogonia [6,7]. Recent studies in mice demonstrated that undifferentiated spermatogonia (As to Aal) maintain the stemness potential [8], where Apr and Aal cells are able to produce new As spermatogonia by spermatogonial clones fragmentation [8].

In addition to transmitting genetic information to the next generation, and being capable to repopulate the germ cell-depleted testis through the germ cell transplantation technique [9,10], SSCs are also able to convert into pluripotent cells that differentiate into somatic tissues [11]. Therefore, investigating SSCs physiology is a crucial aspect of reproductive biology, leading to a better understanding of some causes of male infertility, to the development of novel reproductive biotechnologies [12] and

to the generation of novel cellular models for tissue engineering [11,13]. In this context, many studies have been developed aiming at identifying specific markers for these cells in vertebrates [14,15]. Particularly, a specific SSC marker would be very helpful for the characterization and isolation of these cells [16]. This would facilitate the application of different biotechnologies aiming at preserving the germplasm [17], by using for instance the germ cell transplantation technique [10] or transdifferentiation approaches [11].

Three SSC markers involved in the regulation of self-renewal and themaintenance of the SSC pool in mice have gained special attention. One is a transcription factor known as PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger) and the others are membrane receptors named GFRA1 (GDNF family receptor alpha-1) and CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor) [1,18–24]. Studies performed in the horse have demonstrated that subpopulations of spermatogonia (mainly As) present specific surface glycosylation pattern and this same population of cells are positively labeled for DBA (Lectin, *Dolichos biflorus* agglutinin) [16,25,26] and CT1 (carbohydrate-specific antibody) [16]. However, to date none of the markers that are specific for SSCs in mice and other species have been studied in equids.

As reviewed by Oatley and Brinster (2012) [1], in the testis a balance of SSCs self-renewal and differentiation must be tightly

regulated to ensure continuous spermatogenesis. Signals emanating from a specific microenvironment called “niche” influence all aspects of stem cell function, including self-renewal, differentiation, and apoptosis. Therefore, defining the components of SSC niches in mammalian testes is important for understanding the foundation of sustained spermatogenesis [1]. By definition, the SSC niche is a rich microenvironment formed by growth factor contributions of somatic support cells, including Sertoli, Leydig, and peritubular myoid cells [1]. Recent evidence indicates that Sertoli cells play a major role in establishing the SSC niche in mouse testes, and they may achieve this through orchestrating the contributions of other somatic cell populations [1], particularly those located in the interstitial compartments as found for laboratory rodents [27–29] and donkeys [7]. In this regard, Yoshida and collaborators reported that the vascular network probably plays an important role in determining the SSC niche [30]. A recent study from our laboratory, which used the collared peccary as a model, suggested similar cell-vasculature interactions and also indicated that Leydig cells may induce SSCs to differentiate [31].

Few reports in the literature have investigated the biology of equid spermatogonia [6,7,16]. Therefore, the main objective of the present study was to perform a detailed and comprehensive morphofunctional evaluation of the horse testis. We specifically analyzed spermatogonial kinetics and molecular markers expressed by these cells to understand the SSC niche in this species. Further, we developed comparative studies for two other domestic equid species (donkey and mules). We also investigated the SSC niche during horse breeding and non-breeding seasons.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All surgical procedures were performed by a veterinarian and followed approved guidelines for the ethical treatment of animals. The protocol was approved by the Committee on Animal Experimentation-CETEA, Federal University of Minas Gerais (Permit Number: 056/11). All surgery was performed under anesthesia and analgesia, and all efforts were made to minimize suffering. The animals were anaesthetized with acepromazine and xylazine intravenously followed 15 minutes later by ketamine. Following xylazine administration, lidocaine was administered subcutaneously along the incision line and by intrafunicular injection. Prophylactic and postoperative antibiotic and anti-inflammatory therapy was performed using benzylpenicillin and phenylbutazone respectively.

### Animals and Tissue Preparation

Fourteen adult stallions ( $n = 14$ ), two adult donkeys ( $n = 2$ ) and four adult mules ( $n = 4$ ) were used in this study. The animals were obtained from farms located in the Southeast region of Brazil (Minas Gerais province). For stallions, testes sampling was performed by orchietomy during the breeding season ( $n = 7$ ) (September to March in the South Hemisphere) and during the non-breeding season ( $n = 7$ ). Testis from donkeys and mules were obtained during the breeding season.

After orchietomy, the testes were separated from the epididymides and weighed, then cut longitudinally with a razor blade into small fragments. Testes from eight stallions were fixed by immersion in 4% buffered glutaraldehyde for 12 hours. Tissue samples measuring 2 to 3 mm in thickness were routinely processed and embedded in glycol methacrylate (Leica Histoiresin, Heidelberg, Germany) for histological and morphometric analyses. In order to characterize the different spermatogonial types using high resolution microscopy, samples measuring 1–2 mm in

thickness were embedded in epoxy [27,31]. As it will be described in more details in the western blotting analysis section, testes samples from stallions, mules and donkeys were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for Western blot analysis. Also, testis fragments from six stallions were fixed in Bouin’s solution for immunohistochemical evaluation.

### Spermatogonial Evaluation

**Stages of the seminiferous epithelium cycle.** Stages of the seminiferous epithelium cycle (SEC) were characterized in stallions based on the development of the acrosomic system, morphology of the developing spermatid nucleus and in the overall germ cells associations [7,32,33]. The relative stage frequencies were determined evaluating 150 seminiferous tubule cross sections per each animal, at  $400\times$  magnification.

**Spermatogonial morphology, size and kinetics.** We characterized the morphology of different spermatogonial types in stallions by analyzing images obtained from each stage of the SEC [27,31]. For this purpose, the following morphological nuclear features were evaluated: nucleus shape, presence and disposition of heterochromatin, euchromatin granularity, and extent of nucleolus compaction [27,31]. For each stage of the SEC, spermatogonia were grouped according to their morphological characteristics. The nuclear volume of each spermatogonial type was obtained by measuring the diameter of 30 nuclei of each cell type per animal [31]. Spermatogonial kinetics was performed by counting the different spermatogonial types present in each stage of the SEC and their number were expressed as a ratio per 1000 Sertoli cell nuclei [7,31]. Spermatogonial morphology for donkeys and mules was similar to that described for stallions, and followed the criteria previously described in our laboratory [7,34].

### Western Blotting and Immunostaining Analyses

**Western blotting analysis.** To qualitatively evaluate the presence of specific markers for SSCs (GFRA1, PLZF and CSF1R), immunoblots were performed using total protein lysates from stallion (during the breeding and non-breeding seasons), donkey and mule testes stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For this evaluation, 300 mg of testis parenchyma from each individual investigated were placed in 0.9% NaCl containing protease inhibitors (Sigma Aldrich’s Corp., St. Louis, MO, USA), and the tissues were homogenized and sonicated. After that, the lysates were centrifuged at  $14,000\times g$  for 20 minutes. Supernatants were collected, and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein samples were diluted to 1:2 in a solution of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma Aldrich), 2% glycerol, 0.2% bromophenol blue and, when reducing conditions were required, 1% beta-mercaptoethanol was added in 0.5 M TRIS buffer pH 6.8. The samples were boiled for 5 minutes. Denaturing 12% SDS polyacrylamide mini-gels were prepared and 25  $\mu\text{L}$  samples were loaded into the wells. High-molecular-weight markers (Sigma Aldrich) were run parallel to the samples. Gels were run under a 90 mA current and the separated proteins were transblotted to nitrocellulose membrane for 75 minutes using a 100 mA current. The strips were blocked with 3% BSA (Sigma Aldrich) in TBS for 1 hour at room temperature. Proteins were detected through 90 minutes incubation, at room temperature, with one of the following primary antibodies diluted in TBS 1% BSA: polyclonal goat anti-GFRA1 (1:500, SC-6157, Santa Cruz Biotechnology), monoclonal mouse anti-PLZF (1:200, OP128, Calbiochem) and polyclonal rabbit anti-CSF1R (1:200, ab61137, Abcam). Subsequently, the strips were rinsed three times with TBS 0.05% Triton-X buffer and then incubated for 1 hour with biotinylated anti-goat (for GFRA1; 1:100, ab6740, Abcam), anti-mouse (for PLZF; 1:500,

SAB4600004, Sigma) or anti-rabbit (for CSF1R; 1:200, ab6720, Abcam) IgG antibodies at room temperature. Before exposing the strips to streptavidin solution (Thermo Scientific, TS-125-HR) for 15 minutes at room temperature, they were rinsed three times with TBS 0.05% Triton-X buffer. Prior developing the reaction, the samples were then rinsed twice with TBS 0.05% Triton-X and once with pure TBS buffer. The strips were exposed to DAB solution (Sigma Aldrich) in TBS containing chloronaphthol (Sigma Aldrich), methanol and hydrogen peroxide (Sigma Aldrich) during approximately 1 minute and then washed in water. Finally, the strips were scanned with an Epson Perfection 4990 photo scanner.

**Immunostaining analyses.** In order to evaluate the *in situ* expression of proteins analyzed by Western blotting, we performed immunostaining using the immunoperoxidase method. Slides were analyzed by light microscopy. The tissue samples were fixed in Bouin and embedded in paraplast (Sigma Aldrich). Five micrometer sections were immunostained using protocols specifically developed for each antigen and with antibody dilutions previously tested. After dewaxing and rehydration, antigen retrieval was performed in citrate buffer (pH 6.0) for 5 minutes after boiling in a microwave oven (total period of approximately 10 minutes). For immunohistochemistry, endogenous peroxidase was quenched for 30 minutes with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Aldrich) in PBS at room temperature. Non-specific binding was blocked with Ultra-V-Block (Thermo Scientific) for 30 minutes at room temperature. Primary antibodies GFRA1 (goat polyclonal, 1:500, SC-6157, Santa Cruz Biotechnology), PLZF (mouse monoclonal, 1:200, OP128, Calbiochem), CSF1R (rabbit polyclonal, 1:200, ab61137, Abcam) and Cleaved Caspase-3 (rabbit polyclonal, 1:300, Asp175, Cell Signaling Technology) were applied and the slides were incubated overnight at 4°C. The slides were exposed to biotinylated rabbit anti-goat (for GFRA1; ab 6740, 1:100, Abcam), horse anti-mouse (for PLZF; pk6102, 1:1000, VectorStain ABC kit, Vector Laboratories) and goat anti-rabbit (for CSF1R and Caspase-3; ab6720, 1:200, Abcam) immunoglobulin G (IgG) antibodies during 60 minutes at room temperature. Detection of the signal was performed by incubating the sections in streptavidin for 10 minutes at room temperature, followed by the reaction with peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich) and counterstaining with hematoxylin (Merck). Following dehydration, sections were mounted and analyzed.

In order to quantify the percentage of GFRA1(+), PLZF(+) and CSF1R(+) in type A undifferentiated spermatogonia (Aund) (previously characterized according to morphological criteria), 200 Aund cells were randomly evaluated for each stallion (n = 6), donkey (n = 2) and mule (n = 4). Only for stallions, qualitative double staining immunofluorescence was also performed in the present study. Non-specific background was blocked for 30 minutes with Ultra-V-Block (Thermo scientific) incubation. The proteins were detected using primary antibodies at the following dilutions: GFRA1 (1:50), PLZF (1:50) or CSF1R (1:100). After the incubation with Alexa Fluor secondary antibodies [for GFRA1, 546 anti-goat (1:500) and/or for PLZF and CSF1R, 488 anti-mouse (1:500)] for 1 hour at room temperature, the confocal images were obtained using 40X and 60X oil immersion objectives in a 510 META Laser Scanning Confocal Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), equipped with 488 and 543 nm lasers. Dual channel images were obtained by sequential scanning.

### Spermatogonial Distribution

**Testis morphometry.** The volume densities of the testicular tissue components in stallions were determined by images captured by light microscopy, using a 540-intersection grid from

ImageJ software (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Fifteen randomly chosen fields/images (8100 points) were scored per testis for each animal (n = 8) at 200× magnification. In order to investigate the influence of seasonality in the testicular components, these stallions were divided separated in two groups of four animals.

**Aund distribution in the seminiferous tubules.** In order to investigate the distribution of Aund in stallions, both morphological and immunostaining (GFRA1+) evaluations were considered. In this regard, images from 10 seminiferous tubules cross-sections of each stage of the SEC previously characterized were obtained for each animal and the seminiferous tubules cross-sections were subdivided into four regions, as follows: I) adjacent to another tubule (Tubule-Tubule contact or TT); II) adjacent to the interstitial compartment without blood vessels (Tubule-Interstitial without blood vessels or TI-BV); III) adjacent to the interstitial compartment containing blood vessels (Tubule-Interstitial with blood vessels or TI+BV); and IV) adjacent to the interstitial compartment containing connective tissue (TIC). Considering that the tubular circumference corresponds to 360 degrees, the numbers of Aund cells obtained in the four different regions evaluated were expressed per degree [31]. Therefore, this approach allowed an estimation of the number of these cells located in each region. Also, to verify the possible effects of seasonality in the Aund cells distribution, this analysis was performed in testis samples collected during the breeding and non-breeding season. In order to verify the distribution of these cells facing the intertubular and tubular areas, the number of Aund was also expressed as the total number of cells per degree considering only two regions: TI (i.e. TI-BV + TI+BV + TIC); and TT.

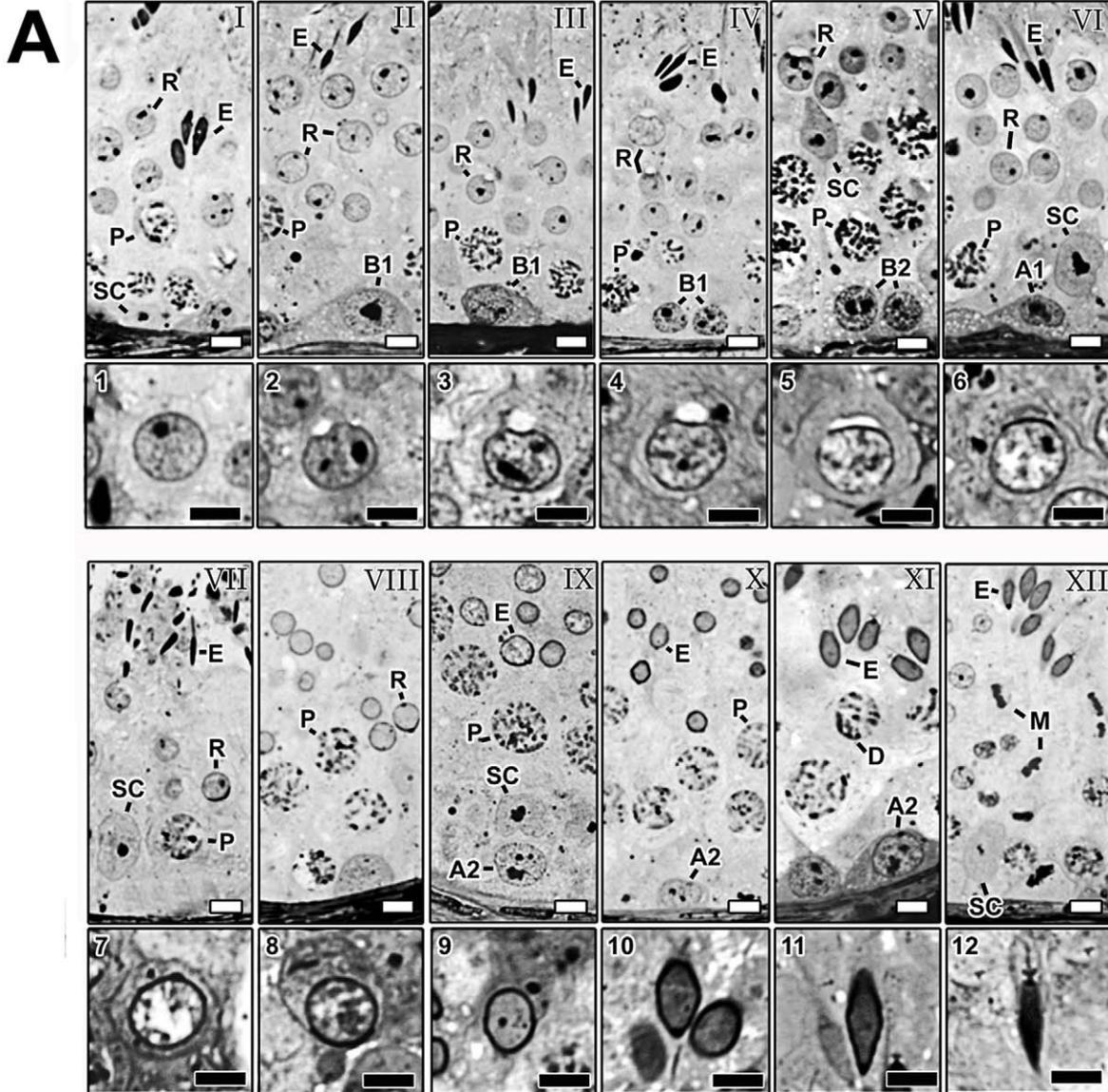
**Statistical analyses.** Parametric data were analyzed by ANOVA and differences were compared by Tukey's test, whereas the Student's "t" test was used for two-parameter analysis. Non-parametric data were compared by Chi-square test. All analyses were performed using the GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc). All data were expressed as mean ± SEM (standard error of the mean) and the significance level considered was p<0.05.

## Results

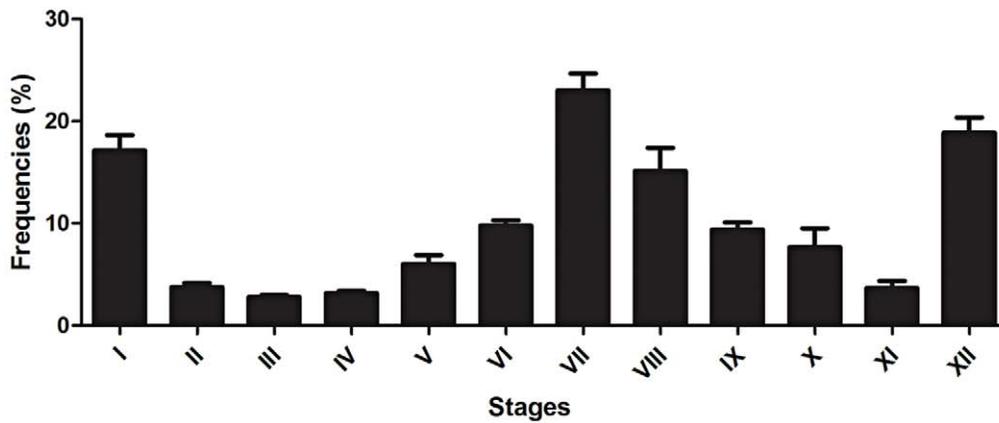
### Stages of the Seminiferous Epithelium Cycle

Based on the development of the acrosomal system in spermatids, twelve stages of the SEC were characterized in stallions (Figure 1A; I–XII). The inserts containing arabic numbers (1 to 12) below each stage in this figure depict the developmental steps of the acrosomic system in spermatids. This is briefly described as follows: the spermiogenic phase started with step 1 spermatids in which acrosomal vesicles cannot be visualized (Figure 1A; 1). Subsequently, a granular vesicle developed (Figure 1A; 2), which gradually flattened and spread laterally over the nucleus surface of round spermatids (Figure 1A; 3–5). In the following stages (Figure 1A; 6–7), the angle formed by the acrosome at the nucleus surface increased progressively, reaching its maximal size at stage VIII (Figure 1A; 8). From this stage on, spermatids nuclei progressively elongated and acrosomes became oriented towards the base of the seminiferous tubules (Figure 1A; 9–12). Spermiation occurred at stage VII. Mean frequency percentages of each of the twelve stages characterized for stallion are shown in Figure 1B. Stages I, VII, and XII presented the highest frequencies, while the lowest frequencies were observed for stages II, III, IV, and XI.

**Stages of the seminiferous epithelium cycle characterized according to the acrosomic system and their mean frequencies in stallions**



**B**



**Figure 1. Stages of the seminiferous epithelium cycle (A) and their frequencies (B) in stallions.** A) The following symbols were used to designate specific germ cell types: A1, type A1 spermatogonia; A2, type A2 spermatogonia; B1, type B1 spermatogonia; B2, type B2 spermatogonia; P, pachytene spermatocyte; D, diplotene spermatocyte; M, meiotic figure; R, round spermatids; E, elongating/elongated spermatids; SC, Sertoli cell. Arabic numerals (1–12) indicate each step of the spermatid acrosome development. B) Note that stages I, VII and XII presented the highest frequencies, whereas the opposite was observed for stages II, III, IV and XI. White and black bars = 5  $\mu$ m.  
doi:10.1371/journal.pone.0044091.g001

### Spermatogonial Morphology, Size and Kinetics

Based on the criteria previously described in our laboratory for donkeys [7] and peccaries [31], spermatogonial cells in stallions were characterized as type A undifferentiated (Aund) and differentiated (A1, A2, A3) and type B (B1 and B2) (Figure 2A). Due to the absence of clear morphological criteria, Aund spermatogonial cells encompassed A single (As), A paired (Apr), and A aligned (Aal). Morphologically, the Aund spermatogonium showed a mottled or granular spherical nucleus with little heterochromatin. In overall, A1, A2 and A3 spermatogonia presented a light and finely granular euchromatin and their heterochromatin gradually increased from A1 to A3. Type B1 and B2 spermatogonia showed ovoid nuclei and presented an increased heterochromatin granularity, which gave to the nucleoplasm a very granular aspect. Morphometric analysis indicated that A2 spermatogonia exhibited the biggest nuclear volume, particularly when compared to type B2 spermatogonia ( $p < 0.05$ ; Figure 2B).

Contrary to Aund cells, which were present in all stages, differentiating spermatogonia were only observed in well-defined stages of the SEC (Figure 2C). In this regard, type A1 cells were found at stages VII, VIII and IX, type A2 cells were observed at stages X and XI, while type A3 cells were present at stages XII and I. With reference to type B spermatogonia, B1 cells were observed at stages II, III and IV, while B2 cells were found at stages V and VI. The kinetics of differentiating spermatogonia indicated a gradual increase in cell numbers from type A1 to type B2 spermatogonia, with a decrease from A3 to B1 that was however not significant. As illustrated in Figure 2D, caspase-3 immunostaining frequently detected apoptosis in differentiating type A spermatogonia, which explains that the increase in cell number was not exponential. With reference to Aund spermatogonia (Figure 2C), our kinetics studies indicated that these cells proliferated, with the highest cell number observed at stage VI, just before they were expected to differentiate into A1 cells. Subsequently, an abrupt decrease ( $p < 0.05$ ) was observed at stage VII, while their number increased again throughout the following stages. Overall however, Aund cell numbers were not significantly different throughout the stages of spermatogenesis, except for stage VII.

### GFRA1, PLZF and CSF1R Immunostaining and Western Blotting

Using immunohistochemistry, we detected expression of GFRA1, PLZF and CSF1R by Aund spermatogonia in all three equid species investigated. Aund cells could be visualized as single, pairs and chains of spermatogonia (Figures 3A, 4A, and 5A). While expression of the transcription factor PLZF was limited to the nucleus of Aund (Figure 4A; arrowheads), expression of both membrane receptors GFRA1 and CSF1R was confined to the membrane/cytoplasm of these cells (Figures 3A and 5A; arrowheads). Expression of GFRA1 (~47 kDa), PLZF (~80 kDa), and CSF1R (~130 kDa) was confirmed by immunoblotting of testis lysates obtained from horses (during the breeding and non-breeding season), donkeys and mule (Figures 3B, 4B, 5B).

### Percentage of Aund Cells Positive for GFRA1, PLZF and CSF1R

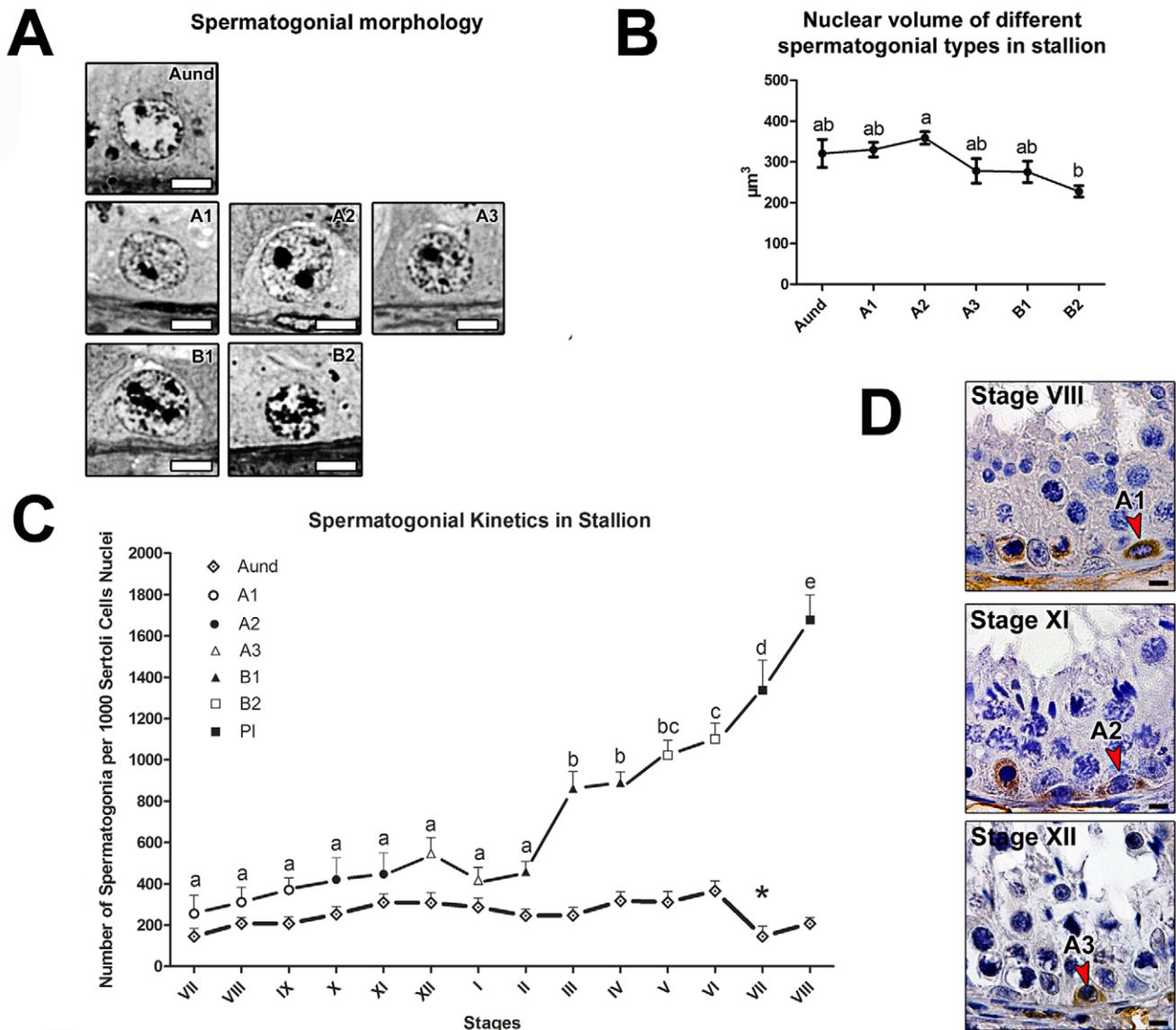
As explained above, Aund include A single (As), A paired (Apr), and A aligned (Aal) spermatogonia. In the immunolabeling quantitative analysis for horses, we observed that approximately 90 and 80% of Aund cells expressed GFRA1 and PLZF respectively (Figures 3C and 4C). In contrast, only one third of these cells were labeled for CSF1R (Figure 5C). In order to better understand marker distribution, a qualitative double-labeling analysis was performed for GFRA1, PLZF, and CSF1R (Figure 6). Our data suggest that these proteins are differently expressed in distinct subsets, or subpopulations, of Aund spermatogonia. Indeed, some GFRA1 positive cells were negative for PLZF or CSF1R (Figures 6B and 6D). Figure 6E summarizes the percentages of Aund immunolabeled for the three markers evaluated in horses. The results obtained for the immunolabeling quantitative analysis performed for donkeys (D) and mules (M) were very similar to those obtained for horses, as follow: GFRA1 (D:  $87.5 \pm 2.5\%$ ; M:  $93 \pm 1\%$ ); PLZF (D:  $76.5 \pm 3.5\%$ ; M:  $83.5 \pm 1.5\%$ ); and CSF1R (D:  $26.5 \pm 5.5\%$ ; M:  $35.5 \pm 2.5\%$ ).

### Testicular Morphometric Analysis

We measured the volume density of components of the testicular parenchyma in stallions during the breeding (Figure 7A; 1) and non-breeding seasons (Figure 7A; 2). In both periods evaluated, we observed that the seminiferous tubules occupied about 75% of the testis parenchyma. During the breeding season, half of the intertubular compartment was occupied by Leydig cells, while in the non-breeding period connective tissue was the predominant component (~40%) of this compartment. Connective tissue occupied approximately one third of the interstitium in the breeding season. The volume density of blood vessels was very similar in the two periods investigated. Based on the percentage of testicular components in the testis parenchyma, and in order to investigate spermatogonial distribution, cross-sections of horses seminiferous tubules were subdivided into 4 different regions (Figure 7B): I) adjacent to another tubule (TT); II) next to the interstitial compartment with blood vessels (TI+BV); III) adjacent to the interstitial compartment without blood vessels (TI-BV); and IV) next to the interstitial compartment containing connective tissue (TIC).

### Spermatogonial Distribution

According to the four seminiferous tubules regions considered, and based on morphological and GFRA1 immunolabeling evaluations (Figure 8A–P), GFRA1(+) Aund spermatogonia were predominantly located ( $p < 0.05$ ) in the areas where the tubule faced the interstitial compartment containing blood vessels (TI+BV) (Figures 8E–G and 8M–O). Except for the blood vessels area, GFRA1(+) Aund spermatogonia distribution was similar in the other three areas investigated. As clearly evidenced in Figure 8H and P, the total number of Aund facing the interstitium is about 3-fold higher than the total number of Aund located in the tubule-tubule area ( $p < 0.05$ ). Also, using both morphological and immunostaining evaluations, Aund distribution pattern was not affected by seasonality.



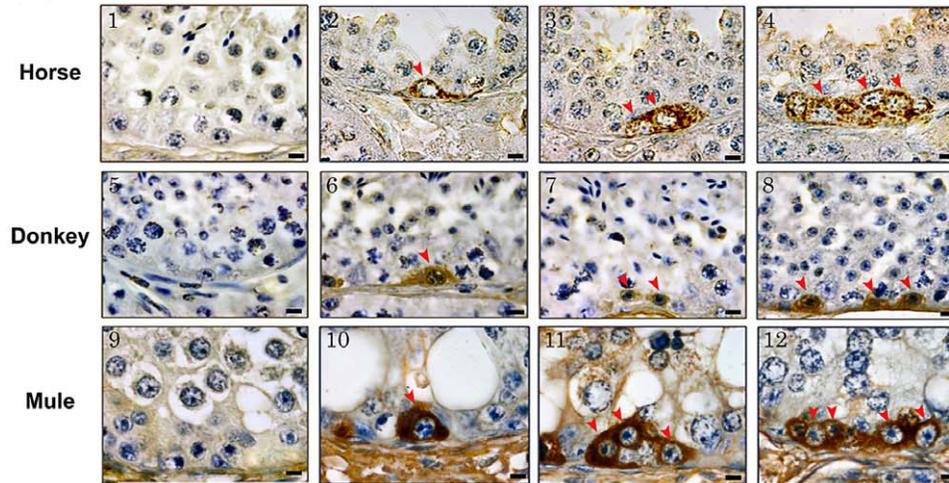
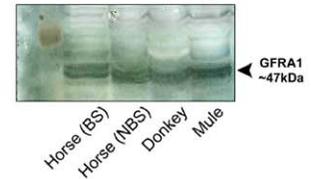
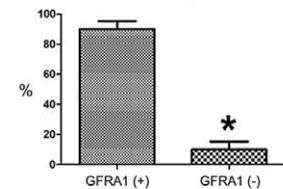
**Figure 2. Spermatogonial types and their kinetics in the stallion seminiferous epithelium cycle.** A) High-resolution light photomicrographs of spermatogonial cells: Aund and differentiated spermatogonia (type A1, A2, A3, B1 and B2), showing their nuclear size and details that allowed their morphological identification. B) Nuclear volume of the different spermatogonial types characterized showing that A2 presented the highest value, particularly in comparison to type B2 spermatogonia. C) Number (kinetics) of Aund and differentiated spermatogonial cells and preleptotene spermatocytes (PI) per 1000 Sertoli cell nuclei. Note that, except for stages I and II, the values obtained for differentiated spermatogonia increased gradually, whereas the numbers of Aund were relatively stable, reaching their lowest level at stage VII. D) Illustration of the immunolocalization of active caspase-3 in differentiated type A (A1, A2, and A3) spermatogonial cells. Figures A and D, bar = 5  $\mu\text{m}$ . doi:10.1371/journal.pone.0044091.g002

## Discussion

To our knowledge, the present study is the first that investigates the SSC niche in stallions. This study also offers a comparative evaluation of Aund markers in three different domestic equid species (stallions, donkeys and mules). In order to better understand the topology of cellular compartments within the testis, we first characterized the stages of the SEC in stallions according to acrosome development in spermatids. We also characterized the different types of spermatogonia in this species and investigated their distribution in four different regions of seminiferous tubules cross-sections, using morphological and Aund markers criteria. Based on the distribution of GFRA1-positive spermatogonia, our

findings strongly suggest that, similar to the other vertebrate species investigated in this respect, Aund cells in stallions were preferentially located in the areas facing the interstitium, particularly those nearby blood vessels. Also, all three Aund markers investigated (GFRA1, PLZF, and CSF1R) were expressed in stallions, donkeys and mules, which was confirmed by Western blot analysis. These results suggest that the molecular mechanisms driving SSCs physiology and maintenance of the niche are conserved among mammals.

The GFRA1 membrane receptor is considered one of the most useful markers of Aund [23]. Its presence at the surface of these germ cells has been described in mice [23,35–38], pigs [39], domestic cats [40,41], peccaries [31], non-human primates

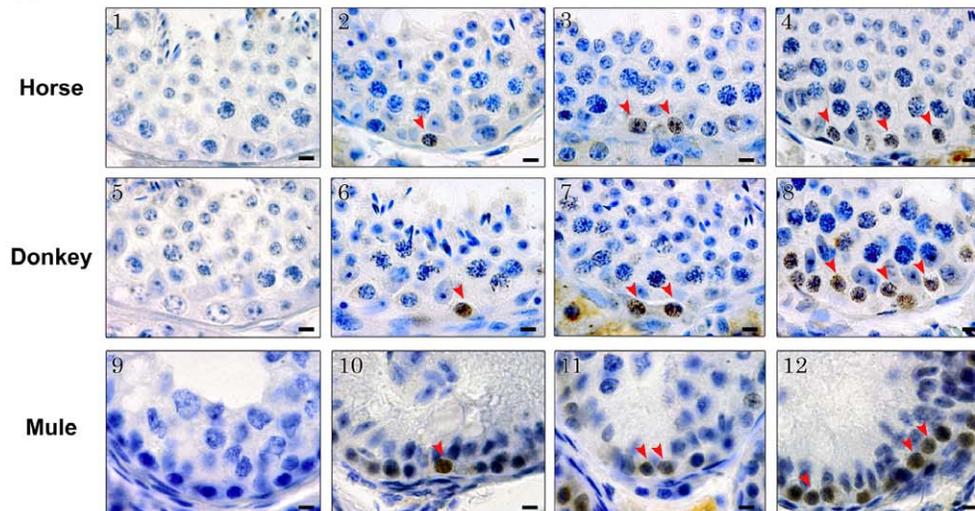
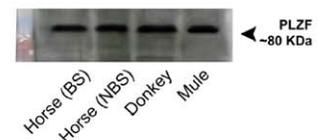
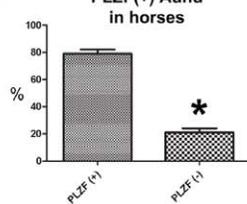
**A GFRA1 immunolabeling****B Western blotting****C Percentage of GFRA1(+) Aund in horses**

**Figure 3. Immunostaining evaluation of the presence of GFRA1 in equids.** A) As it can be noted, the expression of this marker was limited to the cytoplasm of Aund (arrowheads) and this pattern was similar for horse (A2–4), donkey (A6–8) and mule (A10–12). A1, A5 and A9 are the negative controls. B) Immunoblotting confirmed the expression of GFRA1 in the testis of horse [during the breeding (BS) and non-breeding (NBS) season], donkey and mule. C) Percentage of GFRA1(+) Aund cells showing that approximately 90% of these cells express this membrane receptor (\* $p < 0.05$ ). Figure A, bar = 10  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0044091.g003

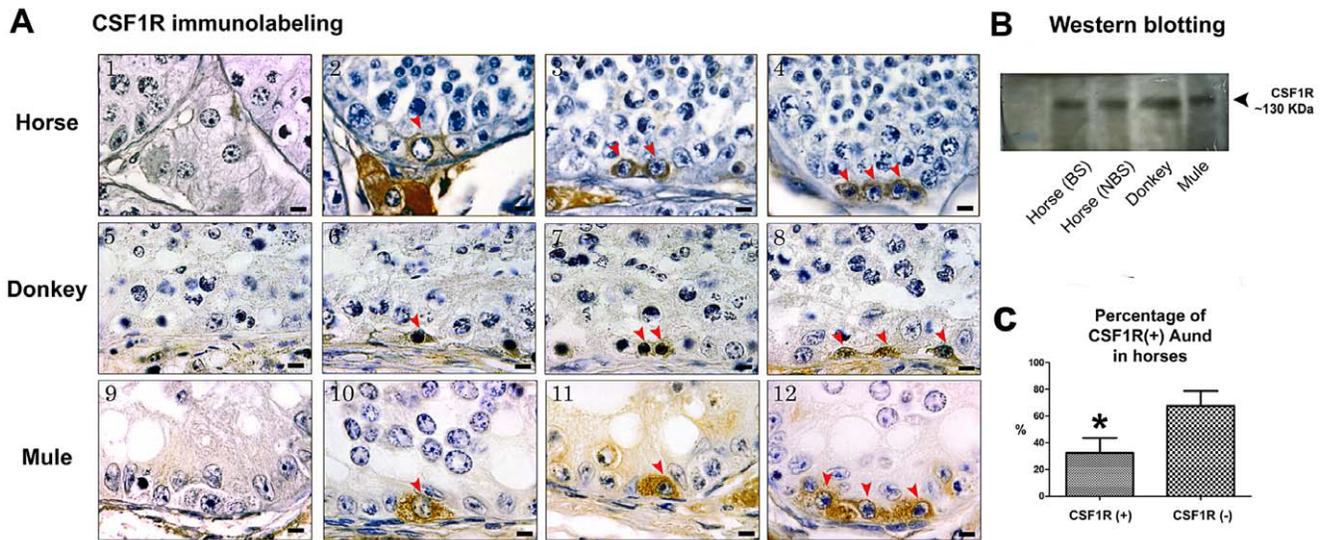
[42,43,44,45] and humans [45,46,47]. The present study is the first to describe the expression of GFRA1 by Aund in equids. We believe that like in mice [18–20,23], GFRA1 is important for SSCs self-renewal in equids. Quantification analysis, qualitatively confirmed by Western blotting, revealed a high prevalence of Aund cells labeled for GFRA1 (~90%) in the stallion testis, suggesting that all subtypes of Aund cells (As, Apr and Aal) were expressing this receptor. The percentage of GFRA1 positive Aund cells found in the present work is similar to the values found for

peccaries (~93%) [31] and mice (90%) [48]. Because A single spermatogonia (As) represent approximately 10% of all Aund cells [5,49], we believe that all Aund subtypes were labeled for GFRA1 in the equid species investigated in this study. However, in order to ascertain that all Aund subtypes express GFRA1, other studies will be necessary, such as whole-mount analysis [50]. In addition, further investigations will be needed to evaluate possible changes in GDNF (GFRA1 ligand) expression by Sertoli cells through the

**A PLZF immunolabeling****B Western blotting****C Percentage of PLZF(+) Aund in horses**

**Figure 4. Immunostaining evaluation of the presence of PLZF in equids.** A) As it can be observed, the expression of this marker was present in the nucleus of Aund (arrowheads) and this pattern was similar for the three equid species investigated (horse, A2–4; donkey, A6–8; and mule, A10–12). Negative controls are shown in A1, A5 and A9. B) Expression of PLZF was confirmed by immunoblotting in the horse testis [during the breeding (BS) and non-breeding (NBS) season], donkey and mule. C) Approximately 80% (\* $p < 0.05$ ) of Aund express this transcription factor. Figure A, bar = 10  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0044091.g004



**Figure 5. Immunostaining evaluation of the presence of CSF1R in equids.** A) As it can be noted, the expression of this marker was limited to the cytoplasm of Aund (arrowheads) and this pattern was similar for horse (A2–4), donkey (A6–8) and mule (A10–12). A1, A5 and A9 are the negative controls. B) Immunoblotting confirmed the expression of CSF1R in the testis of horse [during the breeding (BS) and non-breeding (NBS) season], donkey and mule. C) Percentage of CSF1R(+) Aund cells showing that approximately 35% of these cells express this membrane receptor (\* $p < 0.05$ ). Figure A, bar = 10  $\mu$ m.  
doi:10.1371/journal.pone.0044091.g005

stages of the seminiferous epithelium in horses, as observed for rats [51] and mice [50].

Although slightly less frequent, expression of the transcription factor PLZF was observed in ~80% of Aund in equids. This result, also confirmed by Western blotting, is similar to findings already described in rabbits [52]. PLZF is also highly conserved in mammals, and considered to be involved in self-renewal and maintenance of the SSC pool in mice [21,22], sheep [53], rabbits and primates [42,43,52]. Based on these findings, we can assume that PLZF is also required for Aund/stem cell physiology in equids. In mice SSCs, PLZF activity represses *Kit* and *Ctcf1* gene expression, whose products are both involved in spermatogonial differentiation [54,55]. Consequently, PLZF is co-expressed with OCT4, a marker for primitive stem cells. Future investigations should address these questions in equids.

In the present study, we also show that like in mice [24,56] only one-third of Aund expressed the receptor for colony stimulating factor 1 (CSF1R). CSF1R expression was also confirmed by Western blotting. In the collared peccary, double labeling demonstrated that Aund spermatogonia positive for CSF1R also expressed GFRA1 [31]. Other studies reported the presence of CSF1R in enriched mouse germ cell populations positive for THY1 [24] and GFRA1 [56]. Because colony stimulating factor 1 (CSF1) is secreted by Leydig and peritubular myoid cells in mice [24] and peccaries [31], it would be interesting to investigate a possible role of these somatic cells in the regulation of Aund in equids.

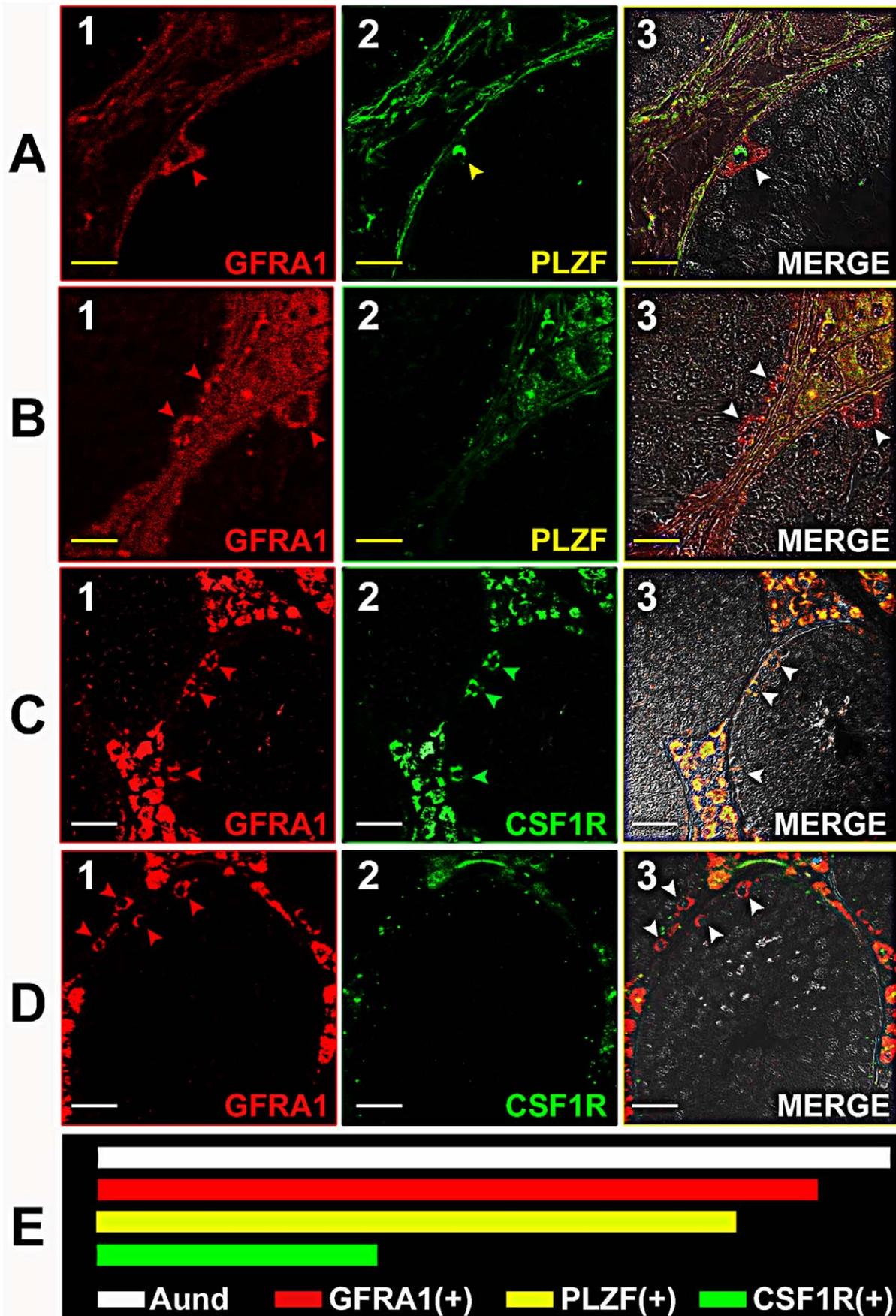
In comparison to the data obtained for rodents [21–24,35–38,48,56], peccaries [31], and equids in the present study, and based on pluripotent markers (LIN28 and POU5F1) [57], the spermatogonial phenotype in man [52,58] and in non-human primates [57,58] seems to be rather different. Also, based on recent data showing that a great number of cytokines and growth factors, such as GDNF and CSF1, are produced by peritubular myoid cell, this somatic cell is now emerging as an important regulator of SSCs self-renew and niche [31,46,59]. Therefore,

future studies should also address this important functional role of the peritubular myoid cells in equids.

To our knowledge, the present study is the first to investigate the distribution of GFRA1 positive spermatogonia in equids. Our data strongly suggest that the interstitium, particularly the vascular network, may play an important role in the regulation of equid SSCs, like in other species [30,31]. Indeed, our findings demonstrate that stallion Aund spermatogonia positive for GFRA1 were preferentially located in the seminiferous tubules areas adjacent to blood vessels. Because there is yet no proven niche factor arising from the vasculature, this important feature is only an indirect reference point for the localization of the niche. However, it has been suggested that the concentration of follicle-stimulating hormone (FSH) is higher near blood vessels and this could stimulate GDNF (the GFRA1 ligand) production by Sertoli cells, creating a specific microenvironment for Aund [60,61].

Due to drastic alterations in the intertubular compartment volume density during the sexually inactive period, an evident niche was not observed in golden hamsters [29]. In the present study, we did not observe any difference in the pattern of Aund distribution between breeding and non-breeding periods. These findings might be related to the fact that in countries where the annual photoperiod variation is less than two hours, effects of seasonality in stallions are not sufficient to promote significant changes in the testis interstitium composition [62]. In studies developed in Texas (USA), the total number of type A spermatogonia (undifferentiated plus differentiated) was significantly reduced in stallions during the non-breeding period [63,64].

In the present investigation, we defined twelve stages of spermatogenesis in equids according to overall germ cells composition and acrosome development. A similar situation was previously described in donkeys [7]. This system of characterization is different from the so-called tubular morphology system, where eight stages of the SEC are always defined, including for stallions [65,66,67]. In addition, we obtained stages frequencies similar to the ones found for donkeys [7], even after grouping of



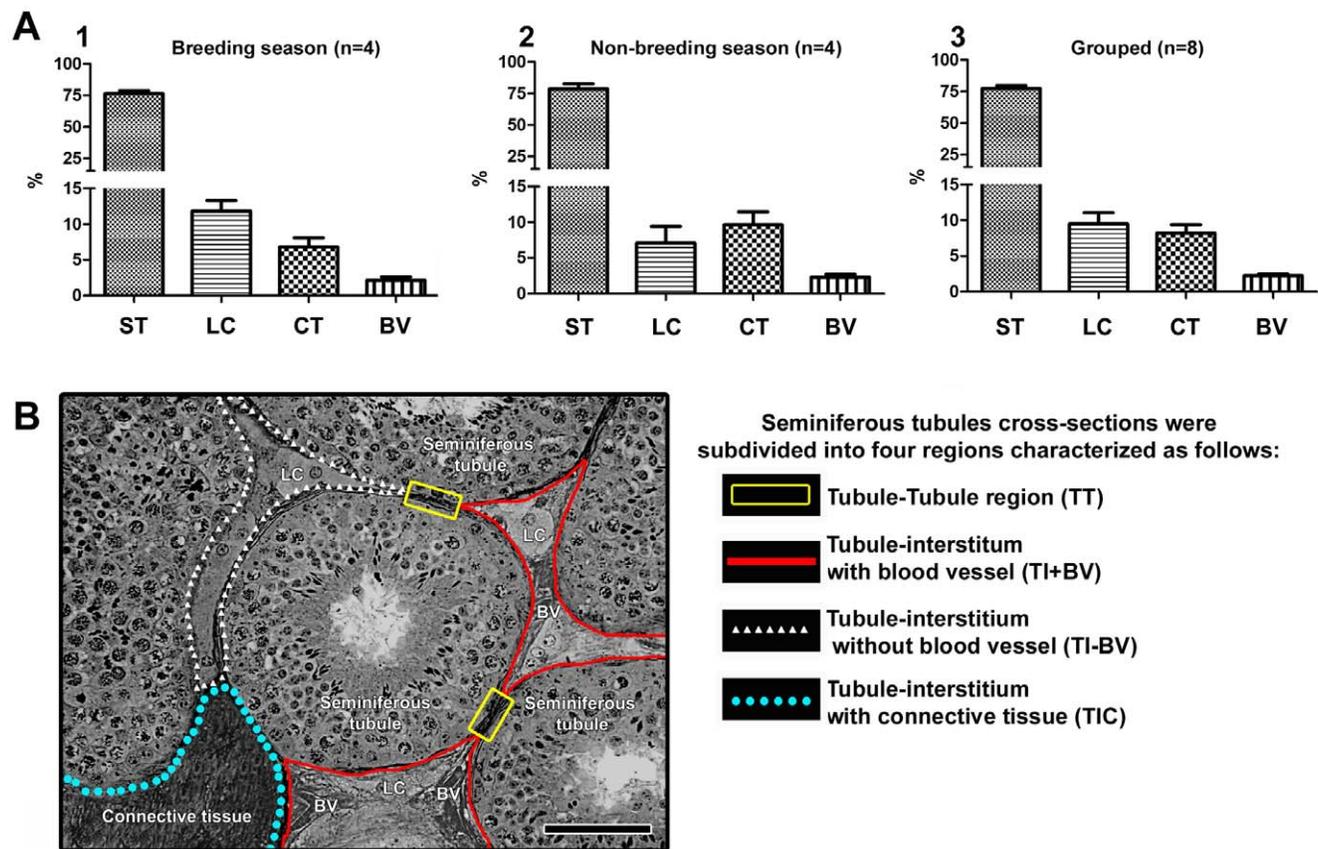
**Figure 6. Qualitative evaluation of the co-localization of the three different spermatogonial markers used for horses.** Considering the co-expression of GFRA1 and PLZF the following pattern was observed: A) GFRA1(+) cells (A1; red arrowhead) presenting co-localization with PLZF (A2; yellow arrowhead), as evidenced in the merged figure (A3; white arrowhead); B) this panel illustrates GFRA1(+) cells (B1; red arrowhead) that do not present PLZF expression (B2), as shown in the merged figure (B3; white arrowhead). In relation to the co-expression of GFRA1 and CSF1R the following labeling pattern was observed: C) GFRA1(+) cells (C1; red arrowhead) also expressing CSF1R (C2; green arrowhead), shown in the merged figure (C3; white arrowhead); D) differently, some GFRA1(+) cells (D1; red arrowhead) do not present CSF1R (D2; white arrowhead in D3 merged figure). E) Summarization of the quantitative data obtained for Aund GFRA1, PLZF and CSF1R positive cells in horses, suggesting that these three proteins are differently expressed in this cell population. Yellow bar = 20  $\mu$ m; White bar = 30  $\mu$ m.  
doi:10.1371/journal.pone.0044091.g006

the pre- and postmeiotic stages. This finding reinforces the hypothesis that stage frequencies may be phylogenetically determined among members of a same family [32,68].

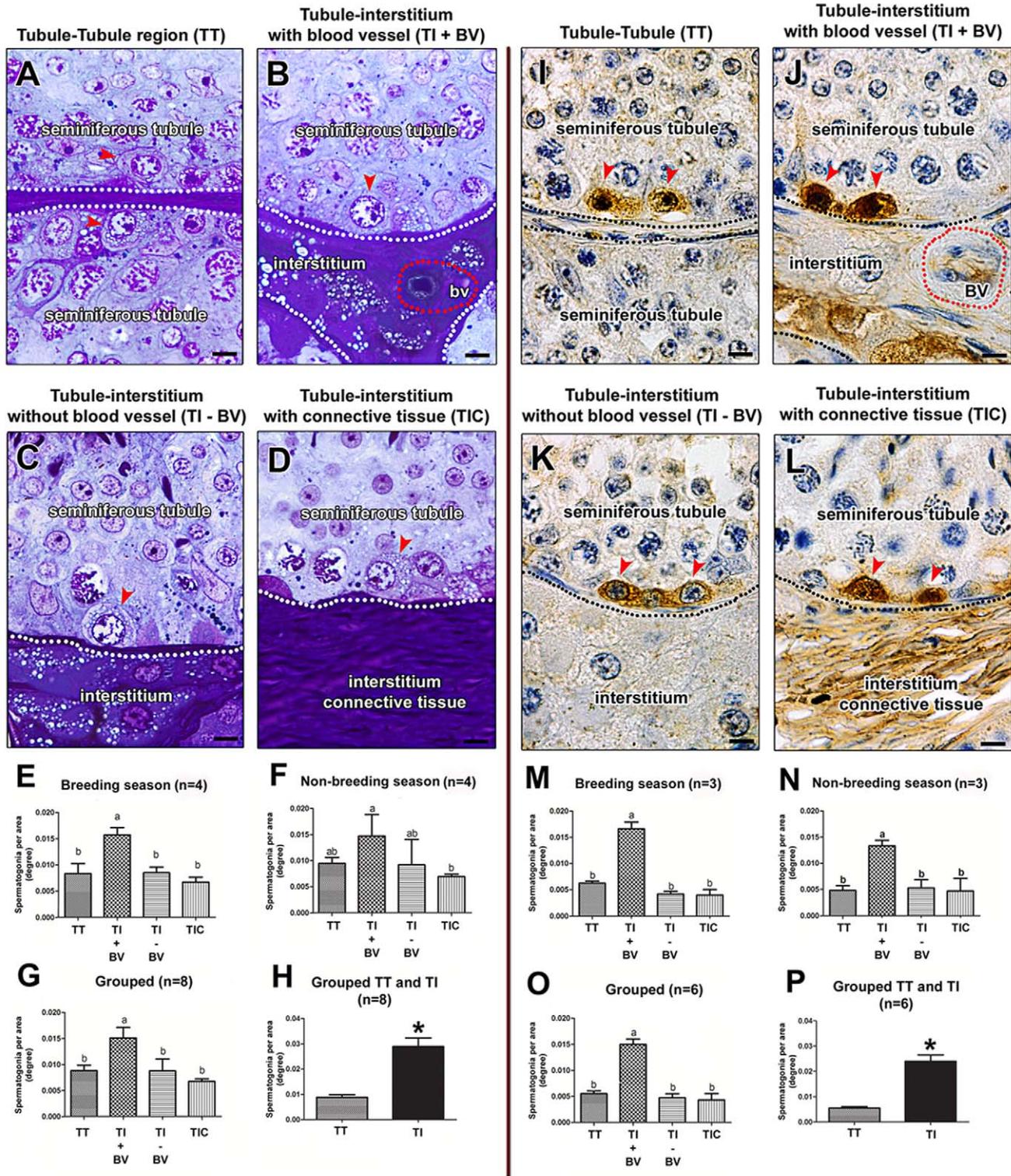
The different types of stallion spermatogonia exhibited morphological characteristics already described in donkeys [7]. Interestingly, the pattern found for nuclear volume, where the maximum value was observed for type A2 spermatogonia, was very similar to the one observed in mice [69]. As expected from the literature [5,7], a gradual increase in cell numbers from type A1 to type B2 spermatogonia was observed in stallions. However, probably due to the high incidence of apoptosis or check points known to occur in the mammalian seminiferous epithelium [5,70], we observed a significant germ cell loss, particularly in the transition from type A to type B spermatogonia [7]. Kinetics of Aund spermatogonia followed the trend observed in rodents [5], donkeys [7] and peccaries [31]. Indeed,

the lowest germ cell number was observed at stage VII of the SEC where sperm release occurs and most of Aund become type A1 spermatogonia [5,7,31].

In summary, our findings suggest that the molecular mechanisms driving SSCs physiology and niche maintenance are conserved among mammals. Also, the characterization of Aund spermatogonia performed in the present study provides for the first time a foundation for future studies of SSCs self-renewal and differentiation in equids. Our data will facilitate isolation and cryopreservation of these cells. In addition, our findings will be very useful for studies involving germ cells transplantation and xenografts of equid testis fragments/germ cells suspensions to preserve the germplasm of valuable animals.



**Figure 7. Testis morphometry in horses, during the breeding and non-breeding season, and seminiferous tubules cross-sections subdivisions.** A) Whereas the seminiferous tubules (ST) volume density was not changed during the two periods evaluated, Leydig cells (LC) and connective tissue (CT) were the most prevalent components of the intertubular compartment during the breeding and non-breeding season. Seminiferous tubules cross-sections were subdivided into 4 different regions according to the prevalence of these aforementioned components (B). BV = blood vessels. Figure B, bar = 100  $\mu$ m.  
doi:10.1371/journal.pone.0044091.g007



**Figure 8. Aund distribution in horses according to morphological (A-H) and immunostaining (I-P) criteria.** As indicated by red arrowheads, using both criteria, Aund cells were present in all four regions considered. However, independently of the breeding season, these cells were more frequently observed in the areas facing the interstitium, particularly nearby the blood vessels. TT=Tubule-Tubule contact; TI-BV=Tubule-Interstitium without blood vessels; TI+BV=Tubule-Interstitium with blood vessels; TIC=Tubule-Interstitium containing connective tissue. Figure A-D and H-K, bar = 10  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0044091.g008

## Acknowledgments

Technical help from Mara Livia Santos as well as the support provided by the Experimental Farm of Pedro Leopoldo - UFMG, are highly appreciated.

## References

- Oatley JM, Brinster RL (2012) The germline stem cell niche unit in Mammalian testes. *Physiol Rev.* 92: 577–595.
- Huckins C (1971) The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec.* 169: 533–557.
- Oakberg EF (1971) Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec.* 169: 515–531.
- Huckins C, Oakberg EF (1978) Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. I. The normal testes. *Anat Rec.* 192: 519–528.
- de Rooij DG, Russell LD (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 21: 776–798.
- Johnson L (1991) Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol Reprod.* 44: 284–291.
- Chiarini-Garcia H, Alves-Freitas D, Barbosa IS, Almeida FR (2009) Evaluation of the seminiferous epithelial cycle, spermatogonial kinetics and niche in donkeys (*Equus asinus*). *Anim Reprod Sci.* 116: 139–154.
- Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE, Yoshida S (2010) Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science.* 328: 62–67.
- Brinster RL, Zimmermann JW (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 11298–11302.
- Honaramooz A, Yang Y (2011) Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals. *Vet Med Int.* 4: pii-657860.
- Simon L, Ekman GC, Kostereva N, Zhang Z, Hess RA, et al. (2009) Direct transdifferentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers. *Stem Cells.* 27: 1666–1675.
- Honaramooz A, Schlatt S, Orwig K, Kim NH (2011) Recent advances in reproductive technologies. *Vet Med Int.* 2011: 915031.
- Caires K, Broady J, McLean D (2010) Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol.* 205: 133–145.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE (2010) Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365: 1663–1678.
- Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B (2012) The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod Biol.* 12: 5–23.
- Klisch K, Contreras DA, Sun X, Brehm R, Bergmann M, et al. (2011) The Sda/GM2-glycan is a carbohydrate marker of porcine primordial germ cells and of a subpopulation of spermatogonia in cattle, pigs, horses and llama. *Reproduction.* 142: 667–674.
- Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL (1996) Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med.* 2: 693–696.
- Treanor J, Goodman L, De SF, Stone D, Poulsen K, et al. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 382: 80–83.
- Worby C, Vega Q, Zhao Y, Chao H, Seasholtz A, et al. (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271: 23619–23622.
- Robertson K, Mason I (1997) The GDNF-RET signalling partnership. *Trends Genet.* 13: 1–3.
- Buaas F, Kirsh A, Sharma M, Mclean DJ, Morris J, et al. (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet.* 36: 647–652.
- Costoya JA, Hobbs R, Barna M, Cattoretti G, Manova K, et al. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet.* 36: 653–659.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M (2005) Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol.* 279: 114–124.
- Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL (2009) Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development.* 136: 1191–1199.
- Verini-Supplizi A, Stradioli G, Fagioli O, Parillo F (2000) Localization of the lectin reactive sites in adult and prepubertal horse testes. *Res Vet Sci.* 69: 113–118.
- Ha TY, Ahn MJ, Lee YD, Yang JH, Kim HS, et al. (2003) Histochemical detection of glycoconjugates in the male reproductive system of the horse. *J Vet Sci.* 4: 21–28.
- Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LD (2001) Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod.* 65: 1179–1185.
- Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD (2003) Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction.* 126: 669–680.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GMJC GFA MCH LRF. Performed the experiments: GMJC GFA JVRN PHACJ SMSNL RGT. Analyzed the data: GMJC GFA JVRN PHACJ SMSNL LRF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MCH LRF. Wrote the paper: GMJC GFA MCH LRF. Surgery and testis sampling of equids: GMJC GFA BSCA.

- do Nascimento HF, Drumond AL, de França LR, Chiarini-Garcia H (2009) Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int J Androl.* 32: 486–497.
- Yoshida S, Sukeo M, Nabeshima Y (2007) A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science.* 317: 1722–1726.
- Campos-Junior PH, Costa GM, Lacerda SM, Rezende-Neto JV, de Paula AM, et al. (2012) The Spermatogonial Stem Cell Niche in the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). *Biol Reprod.* 86: 1–10.
- Hess RA, França LR (2007) Spermatogenesis. Cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY editors. *Molecular mechanisms in spermatogenesis.* Landes Bioscience. p. 1–15.
- Costa GM, Chiarini-Garcia H, Morato RG, Alvarenga RL, França LR (2008) Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology.* 70: 1136–1146.
- Neves ES, Chiarini-Garcia H, França LR (2002) Comparative testis morphology and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod.* 67: 247–255.
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, et al. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 85: 1113–1124.
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J (2000) The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol.* 10: 103–110.
- Dettin L, Ravindranath N, Hofmann MC, Dym M (2003) Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biol Reprod.* 69: 1565–1571.
- von Schönfeldt V, Wistuba J, Schlatt S (2004) Notch-1, c-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. *Cytogenet Genome Res.* 105: 235–239.
- Kuijk KW, Colenbrander B, Roelen BA (2009) The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. *Reproduction.* 138: 721–731.
- Powell RH, Biancardi MN, Pope CE, Leibo SP, Wang G, et al. (2011) 219 Isolation and characterization of domestic cat spermatogonial cells. *Reprod Fert Dev.* 24: 221–222.
- Silva RC, Costa GM, Lacerda SM, Batlouni SR, Soares JM, et al. (2012) Germ cell transplantation in felids: a potential approach to preserving endangered species. *J Androl.* 33: 264–276.
- Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, Sheng Y, Tomko J, et al. (2007) Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells.* 25: 2330–2338.
- Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, et al. (2009) Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Hum Reprod.* 24: 1704–1716.
- Maki CB, Pacchiarotti J, Ramos T, Pascual M, Pham J, et al. (2009) Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes. *Hum Reprod.* 24: 1480–1491.
- Gassei K, Ehmcke J, Dhir R, Schlatt S (2010) Magnetic activated cell sorting allows isolation of spermatogonia from adult primate testes and reveals distinct GFRa1-positive subpopulations in men. *J Med Primatol.* 39: 83–91.
- Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A (2010) Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum Reprod.* 25: 2181–2187.
- He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Zeng W, Dobrinski I, et al. (2012) Isolation of human male germ-line stem cells using enzymatic digestion and magnetic-activated cell sorting. *Methods Mol Biol.* 825: 45–57.
- Grisanti L, Falcatori I, Grasso M, Dovele L, Fera S, et al. (2009) Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation. *Stem Cells.* 27: 3043–3052.
- Tegelembosch RA, de Rooij DG (1993) A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res.* 290: 193–200.
- Grasso M, Fuso A, Dovele L, de Rooij DG, Stefanini M, et al. (2012) Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis. *Reproduction.* 143: 325–332.
- Johnston DS, Olivares E, DiCandeloro P, Wright WW (2011) Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol Reprod.* 85: 763–769.
- Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC, Orwig KE (2010) Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction.* 139: 479–493.

53. Borjigin U, Davey R, Hutton K, Herrid M (2010) Expression of promyelocytic leukaemia zinc-finger in ovine testis and its application in evaluating the enrichment efficiency of differential plating. *Reprod Fertil Dev.* 22: 733–742.
54. Filippini D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, et al. (2007) Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol Cell Biol.* 27: 6770–6781.
55. Hobbs RM, Seandel M, Falcatori I, Rafii S, Pandolfi PP (2010) Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell.* 142: 468–479.
56. Kokkinaki M, Lee TL, He Z, Jiang J, Golestaneh N, et al. (2009) The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod.* 80: 707–717.
57. Aeckerle N, Eildermann K, Drummer C, Ehmcke J, Schweyer S, et al. (2012) The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Mol Hum Reprod.* In press.
58. Ehmcke J, Schlatt S (2006) A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction.* 132: 673–680.
59. Albert S, Wistuba J, Eildermann K, Ehmcke J, Schlatt S, et al. (2012) Comparative Marker Analysis after Isolation and Culture of Testicular Cells from the Immature Marmoset. *Cells Tissues Organs.* In press.
60. Simon L, Ekman GC, Tyagi G, Hess RA, Murphy KM, et al. (2007) Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp Cell Res.* 313: 3090–3099.
61. de Rooij DG. (2009) The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech.* 72: 580–585.
62. Berndtson WE, Squires EL, Thompson DL Jr (1983) Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology.* 20: 449–457.
63. Johnson L (1985) Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. *Biol Reprod.* 32: 1181–1190.
64. Johnson L, Thompson DL Jr (1987) Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *J Reprod Fertil.* 81: 227–232.
65. Swierstra EE, Gebauer MR, Pickett BW (1974) Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. *J Reprod Fertil.* 40: 113–123.
66. Johnson L, Hardy VB, Martin MT (1990) Staging equine seminiferous tubules by Nomarski optics in unstained histologic sections and in tubules mounted in toto to reveal the spermatogenic wave. *Anat Rec.* 227: 167–174.
67. Johnson L, Kattan-Said AF, Hardy VB, Scrutchfield WL (1990) Isolation and staging of horse seminiferous tubules by transillumination. *J Reprod Fertil.* 89: 689–96.
68. França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: Martynetz F, Regadera J, editors. *Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview.* Churchill Livingstone: p. 197–219.
69. Auharek SA, França LR (2010) Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat.* 216: 577–588.
70. Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM (2002) Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod.* 66: 950–958.