

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

TRANSPLANTES SINGÊNICO E XENOGÊNICO DE ESPERMATOGÔNIAS TRONCO EM
GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) ADULTOS.

DOUTORANDO: Robson Campos Silva
ORIENTADOR: Luiz Renato de França

BELO HORIZONTE
2009

ROBSON CAMPOS SILVA

TRANSPLANTES SINGÊNICO E XENOGÊNICO DE ESPERMATOGÔNIAS TRONCO EM
GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) ADULTOS.

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: Prof. Dr. Luiz Renato de França.

BELO HORIZONTE

2009

Este trabalho é dedicado à minha esposa Cássia, meus filhos Lucas e Thiago, e aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À Deus, princípio de todas as coisas;

Ao professor Luiz Renato de França pela competente orientação e entusiasmo demonstrados em todas as etapas deste trabalho;

Ao professor Hélio Chiarini-Garcia pela amizade, compreensão e valiosas idéias;

À professora Karin B. Böttger pelo companheirismo e auxílio na aquisição e manutenção dos gatos utilizados em todas as fases deste trabalho;

Ao Leonardo M. Andrade, da Associação Bichos Gerais, pela cooperação e disponibilização das jaguatiricas utilizadas no presente trabalho;

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular;

Ao Adriano, Mara e Rachel, técnicos do Laboratório de Biologia Celular;

Ao CDTN pela parceria na irradiação dos animais;

Ao técnico do CDTN, José Marcos Messias;

Ao Departamento de Ciências Básicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela minha liberação para cursar o doutorado;

Às fundações que financiaram o desenvolvimento deste projeto, CAPES, CNPq e FAPEMIG;

Ao corpo administrativo do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

A todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

Meus sinceros agradecimentos.

Esta tese foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Luiz Renato de França e com o auxílio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

SUMÁRIO

Resumo.....	10
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1. Felinos.....	12
1.1. Jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>).....	13
2. Espermatogênese em mamíferos.....	14
3. Transplante de espermatogônias tronco.....	17
Referências bibliográficas.....	23
CAPÍTULO 1: ESTEREOLOGIA DO TESTÍCULO, DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA EM JAGUATIRICAS (<i>Leopardus pardalis</i>).....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	36
1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	38
2.1. Animais.....	38
2.2. Injeção de timidina e preparação do tecido.....	38
2.3. Estereologia.....	39
2.4. Estádios do ciclo do epitélio seminífero.....	39
2.5. Duração do ciclo do epitélio seminífero.....	40
2.6. Contagem e razões entre números celulares.....	40
3. Resultados.....	41
3.1. Dados biométricos e densidade volumétrica do testículo.....	41
3.2. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa dos estádios.....	42
3.3. Duração do ciclo do epitélio seminífero.....	44
3.4. Morfometria do testículo.....	45
4. Discussão.....	45
Figuras e tabelas.....	50
Referências bibliográficas.....	58
CAPÍTULO 2: O GATO DOMÉSTICO (<i>Felis catus</i>) COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O TRANSPLANTE DE ESPERMATOGÔNIAS TRONCO EM FELÍDEOS.....	63
Resumo.....	63
1. Introdução.....	65
2. Material e métodos.....	66
2.1. Animais.....	66
2.2. Depleção das células germinativas.....	67
2.2.1. Tratamento com busulfan.....	67
2.2.2. Tratamento com irradiação fracionada local.....	67
2.2.3. Avaliação da depleção da espermatogênese endógena.....	68
2.3. Preparação e enriquecimento da suspensão celular para serem transplantadas.....	68
2.4. Marcação das células selecionadas.....	69

2.5. Padronização da via de transplante.....	69
2.6. Transplante das células germinativas.....	70
2.7. Avaliação dos testículos transplantados.....	71
2.8. Avaliação morfológica e morfométrica dos espermatozóides.....	71
2.9. Análise estatística.....	72
3. Resultados.....	72
3.1. Efeitos do busulfan nos testículos.....	72
3.2. Efeitos da irradiação nos testículos.....	73
3.3. Dissociação enzimática do parênquima testicular, enriquecimento e marcação das espermatogônias e via de injeção do transplante.....	74
3.4. Avaliação dos testículos no transplante singênico.....	74
3.5. Avaliação dos testículos no transplante xenogênico.....	75
3.6. Morfologia dos espermatozóides.....	75
4. Discussão.....	76
Figuras e tabelas.....	84
Referências bibliográficas.....	96
Anexos: Trabalho publicado.....	103

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1: ESTEREOLOGIA DO TESTÍCULO, DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA EM JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis*)

Figura 1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero da jaguatirica.....	51
Figura 2. Marcação das células germinativas da jaguatirica com timidina triciada.....	52
Figura 3. Diagrama ilustrativo dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em jaguatirica.....	53
Figura 4. Frequência dos oito estádios da jaguatirica baseado no sistema acrossômico.....	54
Figura 5. Frequências comparativas dos estádios do ciclo pré-meiótico, meiótico e pós-meiótico, baseados no sistema acrossômico em jaguatiricas.....	55
Tabela 1. Dados biométricos e morfométricos em jaguatiricas.....	55
Tabela 2. Duração (dias) do ciclo do epitélio seminífero em jaguatiricas.....	56
Tabela 3. Contagens celulares, razões celulares e produção espermática em jaguatiricas.....	56
Tabela 4. Morfometria das células de Leydig em jaguatiricas.....	57
Tabela 5. Parâmetros comparativos relacionado com a estereologia e eventos espermatogênicos em jaguatiricas sexualmente maduras, gatos domésticos e onças pintadas...	57

CAPÍTULO 2: O GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O TRANSPLANTE DE ESPERMATOGÔNIAS TRONCO EM FELÍDEOS

Figura 1. Foto micrografias do testículo de gato após vários procedimentos.....	84
Figura 2. Secções transversais de túbulos seminíferos de gatos controles e tratados com uma única dose de busulfan.....	

Figura 3. Secções transversais de túbulos seminíferos de gatos controles e tratados com duas doses de busulfan.....	85
Figura 4. Percentual de túbulos seminíferos afetados em graus variados pelo tratamento com busulfan.....	86
Figura 5. Secções transversais de túbulos seminíferos de gatos controle e irradiados e analisados após diferentes intervalos de tempo pós-irradiação.....	87
Figura 6. Células germinativas marcadas com PKH26 e com DAPI presentes nos túbulos seminíferos dos gatos receptores observados em diferentes períodos de tempo.....	88
Figura 7. Procedimentos utilizados para o transplante xenogênico (jagatirica – gato doméstico).....	89
Figura 8. Transplante de espermatogônias de jagatiricas para os testículos de gatos domésticos avaliados em diferentes períodos de tempo.....	90
Figura 9. Imagens de espermatozoides de gatos domésticos e de jagatiricas.....	92
Tabela 1. Biometria e morfometria dos testículos em gatos domésticos tratados com busulfan	93
Tabela 2. Biometria e morfometria dos testículos em gatos domésticos tratados com raios-X..	94
	95

Resumo

À semelhança da maioria dos felídeos, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é uma espécie ameaçada de extinção. Para agravar essa situação, o conhecimento da biologia reprodutiva da jaguatirica é muito limitado. O transplante de espermatogônias tronco apresenta enorme potencial em estudos envolvendo biotecnologias aplicadas à reprodução, produção de animais transgênicos e preservação de estoque genético de animais zootécnicos valiosos ou espécies ameaçadas de extinção, podendo também ser utilizado para se investigar o processo espermatogênico e preservar a fertilidade. Além disso, até o presente momento, esta técnica é a única abordagem experimental para se investigar funcionalmente a biologia das espermatogônias tronco. Entretanto, apesar de seu alto potencial, estudos utilizando o transplante de espermatogônias tronco com o intuito de se preservar espécies de mamíferos silvestres são ainda bastante incipientes. O gato doméstico (*Felis catus*) é um modelo em potencial de receptor para a preservação e a propagação de plasma germinal de felídeos em risco ou ameaçados de extinção, representando assim uma alternativa para a propagação do genoma de jaguatiricas. No entanto, pelo fato da biologia reprodutiva da jaguatirica ser ainda muito limitado, para se efetuar eventualmente o transplante de suas células germinativas para gatos domésticos, o melhor conhecimento de sua função testicular é necessário. Neste contexto, a caracterização morfológica das células germinativas, bem como o conhecimento da duração do ciclo do epitélio seminífero, são ferramentas em potencial para se acompanhar o desenvolvimento de células espermatogênicas transplantadas. Desta forma, nossos objetivos iniciais no presente estudo foram os de se investigarem os aspectos básicos da estrutura do testículo de jaguatiricas, particularmente em relação ao processo espermatogênico. Os resultados principais encontrados mostraram que a morfologia das células germinativas de jaguatiricas foi similar à do gato doméstico, sugerindo que a morfologia destas células não seria um marcador adequado para se distinguir as células germinativas destas duas espécies. Quanto à duração total do processo espermatogênico, os resultados obtidos mostraram que cerca de oito semanas são necessárias para que este processo se complete em jaguatiricas, desde espermatogônias tronco até a formação de espermatozóides. Os outros objetivos deste estudo foram os de se padronizarem todas as abordagens necessárias para o transplante singênico de espermatogônias tronco entre gatos domésticos e o xenogênico de jaguatirica para o gato doméstico. Nesta etapa de nossos estudos também tivemos como objetivos avaliar se as células germinativas transplantadas seriam capazes de

colonizarem e se diferenciarem nos testículos dos gatos receptores. Pelo fato de ter apresentado resultados mais consistentes quanto à depleção da espermatogênese, e também em relação à recuperação da mesma nos túbulos seminíferos, em comparação com o tratamento utilizando o busulfan, a irradiação com raios-X foi a técnica de eleição para se deprimir a espermatogênese endógena dos gatos domésticos receptores. Nossos resultados mostraram que os procedimentos de isolamento e enriquecimento das espermatogônias tronco foram bastante eficientes, permitindo que estas células, após serem marcadas com o PKH26, fossem transplantadas com sucesso através da via cirúrgica (*rete testis* extratesticular) por nós padronizada. Nos transplantes singênicos, os diferentes períodos de tempo por nós utilizados (quatro a sete semanas), mostraram que nos túbulos seminíferos analisados, as células germinativas marcadas com PKH26 foram capazes de colonizarem e se diferenciarem até a fase de espermátides alongadas. Em relação ao transplante xenogênico, pelo fato do intervalo de tempo utilizado ter sido mais amplo (de duas a treze semanas), células germinativas de jaguatirica, desde espermatogônias até espermatozóides, foram encontradas nos túbulos seminíferos e no epidídimo dos gatos domésticos avaliados. Estes resultados bastante positivos para o transplante xenogênico demonstraram que os testículos dos gatos receptores apresentaram ambiente bastante propício para o estabelecimento e o desenvolvimento do processo espermatogênico de jaguatiricas, que divergem filogeneticamente dos gatos domésticos em somente cerca de dois milhões de anos. Pelo fato da família Felidae, que é formada por 37 espécies, descender de um ancestral comum que existiu cerca de 10-11 milhões de anos atrás, os resultados inéditos e promissores encontrados no presente estudo sugerem que o gato doméstico apresenta alto potencial para ser utilizado como animal receptor para a preservação do genoma de felídeos selvagens.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. Felinos

Atualmente é consenso que a utilização desordenada dos recursos naturais promove a destruição ou diminuição de ecossistemas naturais, com implicações irreversíveis nas populações selvagens (WWF, 2008). Pois, conforme já é sabido, a constante ocupação de território tem nos levado à destruição e fragmentação de ecossistemas. Como consequência, algumas espécies têm desaparecido e outras, por exemplo, ficam aprisionadas dentro de algumas ilhas de florestas. Esse isolamento leva a perdas de patrimônio genético devido à ausência de trocas nas informações genéticas das populações envolvidas (O'Brien et al., 1985; Roelke et al., 1993). Além do mais, um grande número de animais está desaparecendo devido à transformação de seu habitat em centros de agricultura e são sistematicamente eliminados devido aos danos financeiros causados aos fazendeiros (Silva et al., 2004). Dessa forma, todos os esforços visando à conservação das espécies em risco de extinção são valiosos para serem utilizados no planejamento da manutenção de populações selvagens.

A família Felidae, composta pelos predadores mais bem sucedidos na terra, é composta por 37 espécies e com exceção dos gatos domésticos e outras espécies de gatos de menor porte, são consideradas em perigo ou ameaçadas de extinção pelos órgãos internacionais como a CITES (Convention of International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora) e por pesquisadores na área (Pelican et al., 2006; Baudi et al., 2008). Além disso, na família Felidae, a presença da teratospermia (produção maior que 60% dos espermatozoides anormais por ejaculado) é relativamente comum, tendo-se obtido boas evidências de que a redução da diversidade genética contribui particularmente para esse fenômeno (Pukazhenthil et al., 2006).

Por outro lado, a família dos felídeos constitui excelente modelo biomédico para se estudar doenças hereditárias, agentes de doenças infecciosas, estudos de divergência evolucionária adaptativa, conservação dos estoques genéticos e aplicações forenses (O'Brien et al., 2002). Adicionalmente, os felídeos são utilizados como modelo para estudos relacionados à biologia do desenvolvimento, fisiologia e neurociências (O'Brien et al., 2008).

Considerando a importância da propagação de animais mantidos em cativeiro para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, o conhecimento da biologia reprodutiva de felídeos silvestres deve ser um importante aliado para a preservação

destas espécies, permitindo, por exemplo, que a reprodução assistida possa se tornar uma ferramenta efetiva na preservação destas espécies (Paz et al., 2006). Neste contexto, a inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões são importantes ferramentas para auxiliar na conservação de espécies ameaçadas de extinção. Entretanto, além de requerer o conhecimento da função testicular, o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida requer conhecimento acurado do funcionamento do ciclo reprodutivo da fêmea e o controle preciso da atividade ovariana (Pelican et al., 2006). Alguns progressos têm sido alcançados utilizando-se de reprodução assistida em felídeos ameaçados de extinção, dentre eles a jaguatirica (Swanson & Brown 2004).

A conservação de qualquer espécie animal exige o conhecimento acurado sobre sua biologia reprodutiva. Existem poucos estudos abordando a biologia reprodutiva em felídeos machos. Dentre estes, ressaltamos o estudo com gatos domésticos (*Felis catus*), o qual forneceu informações inéditas e detalhadas sobre o processo espermatogênico e duração da espermatogênese nesta espécie (França & Godinho, 2003) e o estudo recente com onças pintadas (*Panthera onca*), sobre o processo espermatogênico e duração da espermatogênese (Costa et al., 2008), constituindo-se importantes fontes de dados para estudos futuros envolvendo a biologia reprodutiva comparada de felídeos.

1.1. Jaguatirica (*Leopardus pardalis*)

A jaguatirica é um gato de tamanho médio (7–15,8 kg de peso corporal), que ocupa uma grande variedade de ecossistemas, desde florestas úmidas até a caatinga (Eizirik et al., 1998). A jaguatirica encontra-se distribuída geograficamente desde o sul dos Estados Unidos (Texas) ao México, América central e América do sul (IUCN, 2009). As jaguatiricas são sistematicamente capturadas por caçadores interessados no alto valor comercial de suas peles. Dentre as onze subespécies existentes de *Leopardus pardalis*, praticamente todas são consideradas em risco de extinção (O'Brien et al., 2005; Pelican et al., 2006; Baudi et al., 2008). No Brasil, as populações de *Leopardus pardalis* encontradas fora da bacia Amazônica são consideradas como vulneráveis a extinção (Machado et al., 2008). Similar às outras espécies de felídeos selvagens, existe poucos dados sobre a biologia reprodutiva do *Leopardus pardalis* (Morais et al., 2002; Baudi et al., 2008).

Dessa forma, informações sobre a caracterização dos estádios da espermatogênese, a estimativa da duração do ciclo do processo espermatogênico e a

eficiência espermática, seriam úteis, uma vez que a obtenção desses dados permite comparações entre as espécies de felídeos onde esses parâmetros já são conhecidos, como por exemplo, o gato doméstico e a onça pintada. Além disso, conforme será visto adiante, o conhecimento destes dados será importante em estudos envolvendo o transplante de espermatogônias.

2. Espermatogênese em mamíferos

O processo espermatogênico é um evento cíclico complexo, altamente organizado e coordenado, no qual as espermatogônias diplóides se diferenciam em espermatozóides maduros. Com base em características morfofuncionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (b) fase meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase muito importante para a diversidade genética entre membros da mesma espécie; e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, em que as células haplóides formadas se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (Russell et al., 1990, Hess & França 2007).

Na fase espermatogonial (proliferativa), as espermatogônias tronco se dividem originando outras espermatogônias tronco ou células germinativas comprometidas com a formação de espermatozóides (autorrenovação ou diferenciação). As espermatogônias tronco fazem parte de uma subpopulação de espermatogônias denominadas de indiferenciadas, compostas pelas espermatogônias $A_{isoladas}$ (espermatogônias tronco), espermatogônias $A_{pareadas}$ e espermatogônias $A_{alinhadas}$. A outra subpopulação é denominada espermatogônias diferenciadas, sendo compostas das espermatogônias A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , Intermediárias e espermatogônias tipo B. Além desta definição funcional, no testículo de mamíferos as espermatogônias tronco são morfológicamente caracterizadas como as únicas espermatogônias sem pontes intercelulares (de Rooij & Russell, 2000).

Trabalhos recentes, fundamentados em características morfológicas, sugerem que as espermatogônias indiferenciadas possuem localização preferencial (nicho) nos túbulos seminíferos em camundongos, ratos e hamsteres (Chiarini-Garcia et al., 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; Nascimento et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se técnica de transplante de células germinativas, o qual demonstrou que as espermatogônias indiferenciadas se localizam preferencialmente em regiões dos

túbulos seminíferos adjacentes aos vasos sanguíneos e as células de Leydig (nicho) e à medida que se diferenciam, as células resultantes se afastam dessa região do túbulo (Yoshida et al., 2007). Estudos recentes indicam que as células de Sertoli presentes nos túbulos seminíferos também participam da formação do nicho, secretando fatores de crescimento que regulam a autorrenovação das espermatogônias tronco, como ERM (Ets related molecule ou ETV5 - Ets variant gene 5), GDNF e FGF2, além de fatores que promovem a diferenciação, como a activina A, BMP4 e SCF, enquanto as células de Leydig contribuem com a secreção do CSF1, que também pode ser importante na formação e manutenção do nicho (Chen et al., 2005; Morrow et al., 2007; de Rooij, 2009). As espermatogônias apresentam o CSF1R e quando estes receptores são ativados, as espermatogônias tronco se proliferam (Kokkinaki et al., 2009). As moléculas que atuam na formação e manutenção do nicho são discutidas em recente revisão (Lucas et al., 2009). As espermatogônias A_{pareadas} e $A_{\text{alinhadas}}$, que estão comprometidas com a diferenciação e a formação de espermatozóides, quando sofrem injúrias, como à irradiação, que quebram suas pontes citoplasmáticas, comportam-se como espermatogônias tronco (de Rooij & Grootegoed 1998; de Rooij 2001). Neste sentido, estudo recente usando o transplante de espermatogônias como abordagem experimental, confirmou que as espermatogônias A_{pareadas} e $A_{\text{alinhadas}}$ possuem a capacidade de repopular o testículo, de forma similar às espermatogônias tronco. Estes autores denominaram a espermatogônias tronco A_{isoladas} de espermatogônias tronco verdadeira e as espermatogônias A_{pareadas} e $A_{\text{alinhadas}}$ de espermatogônias tronco potencial (Nakagawa et al., 2007). Já as espermatogônias em diferenciação, que anteriormente foram consideradas irreversivelmente comprometidas com a formação de espermatozóides (de Rooij 2001), demonstraram (espermatogônias diferenciadas $c\text{-kit}^+$) possuir a capacidade de repopular e restabelecer o processo espermatogênico em testículos de animais receptores (Barroca et al., 2009). Conforme descrito acima, as espermatogônias comprometidas com a diferenciação (A_{pareadas} e $A_{\text{alinhadas}}$), bem como as diferenciadas ($c\text{-kit}^+$) podem, em situações especiais (injúria ou transplante), adquirir características típicas de espermatogônias tronco.

O processo espermatogênico é formado por associações celulares denominadas de estádios, que podem ser segmentados (somente um estágio por secção transversal) nos mamíferos domésticos (França et al., 1998) ou helicoidal em alguns primatas, incluindo o homem (Sharpe, 1994). Estas associações podem ser classificadas de acordo com a morfologia dos núcleos das espermátides e associação das mesmas com outros

tipos de células germinativas (morfologia tubular), sendo identificados sempre oito estádios do ciclo do epitélio seminífero (Amann, 1962; Courot et al., 1970). Os estádios podem ainda ser classificados de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico das espermátides (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990; Hess & França, 2007).

O processo espermatogênico dura cerca de 30 a 75 dias nos mamíferos já estudados (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998). A duração deste evento é considerada como uma constante biológica espécie-específica que está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). Também é importante ser mencionado que os valores encontrados para a duração da espermatogênese nas espécies de mamíferos investigadas até o presente momento (~1,5% de aproximadamente 4.000 espécies existentes; Nowak, 1999) sugerem fortemente que fatores filogenéticos não são determinantes para a duração da espermatogênese (França & Cardoso, 1998; França et al., 2005). No entanto, considerável número de estudos sugere fortemente que as frequências dos estádios do ciclo, quando agrupados em pré-meiótico e pós-meiótico, podem ser determinadas pela proximidade filogenética entre as diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998; Leal & França, 2006; Almeida et al., 2006).

Comparado com outros sistemas bem conhecidos de autorrenovação do corpo, a espermatogênese é considerada como um dos que apresenta maior número de divisões celulares durante o seu desenvolvimento. Em várias espécies de mamíferos investigadas neste aspecto, tais como ratos, camundongos, hamster, ovino e suíno, uma espermatogônia tronco passa por aproximadamente 10 divisões celulares antes de se tornar espermátócito, o qual sofre somente duas divisões meióticas. Assim, teoricamente, uma espermatogônia tronco é capaz de formar até 4096 espermatozóides, levando a produção diária de 4 a 40 milhões de espermatozóides por grama de testículo em diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998; de Rooij & Russell, 2000; Hess & França, 2007).

Outro aspecto importante que merece ser ressaltado é o fato do desenvolvimento e função do epitélio seminífero estar intimamente relacionado com o desenvolvimento dos elementos somáticos do testículo (França et al., 2000). Desta forma, as células somáticas são os elementos chave para a função normal do sistema genital masculino (Russell et al., 1994), sendo a célula de Sertoli considerada como o elemento mais importante para o desenvolvimento das células germinativas (Russell & Griswold,

1993; Hess et al., 1993, França et al., 1995; Hess & França, 2007). As células de Sertoli desempenham inúmeras funções, dentre as quais podem ser citadas: suporte e nutrição das células germinativas em desenvolvimento; compartimentalização dos túbulos seminíferos pelas junções de oclusão (propiciam um microambiente protegido e especializado para o desenvolvimento das células germinativas); secreção de fluidos; proteínas e vários fatores de crescimento; fagocitose de células germinativas que sofreram apoptose; fagocitose do excesso de citoplasma das espermatídes; além de liberação dos espermatozóides no interior do lúmen dos túbulos seminíferos (Russell & Griswold, 1993). Pelo fato de possuírem receptores para FSH e andrógenos, a célula de Sertoli também faz a intermediação hormonal do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Hess & França, 2007).

3. Transplante de espermatogônias tronco

O transplante de espermatogônias tronco é uma fascinante abordagem experimental que consiste na remoção de células tronco do testículo do animal doador e a injeção das mesmas no testículo de um receptor. No testículo do animal receptor estas células irão se desenvolver e formar espermatozóides maduros com características genéticas do doador. Esta promissora técnica foi inicialmente utilizada em camundongos por Brinster e colaboradores (Brinster & Zimmermann, 1994; Brinster & Avarbock, 1994) e tem proporcionado enormes avanços no estudo da biologia das espermatogônias tronco e do processo espermatogênico em si, bem como das interações entre células de Sertoli e as células germinativas, além de pesquisas em potencial no campo da agricultura, preservação de espécies ameaçadas de extinção e medicina reprodutiva (Dym, 1994; Hausler & Russell, 1999; França & Russell, 2000; Izadyar et al., 2000; Griswold et al., 2001; McLean et al., 2001; Meachem et al., 2001; Brinster, 2002; Yoshida et al., 2004; Rodriguez-Sosa et al., 2006; Brinster, 2007; Yoshida et al., 2007; Oatley & Brinster, 2008).

Um importante avanço da técnica de transplante foi o sucesso dos transplantes interespecíficos de espermatogônias tronco (rato para camundongo e hamster para camundongo) (Clouthier et al., 1996; Ogawa et al., 1999). Nesta situação de transplante xenogênico, os camundongos receptores são imunodeficientes como o “nude mice” (sem linfócitos T) ou camundongos SCID (sem linfócitos T e B). Neste sentido, células germinativas de coelhos, cães, animais domésticos de grande porte (suínos, bovinos e equinos) e primatas (babuíno) também foram transplantadas para testículos de

camundongos imunodeficientes. No entanto, embora diferentes graus de colonização tenham ocorrido, não foi observado o desenvolvimento da espermatogênese além da fase espermatogonial (Dobrinski et al., 1999; Dobrinski et al., 2000; Nagano et al., 2001). Desta forma, acredita-se que o sucesso do transplante esteja diretamente relacionado com o grau de proximidade filogenética das espécies durante a evolução, como é provavelmente ilustrado pela menor eficiência do transplante entre hamsteres e camundongos, comparado com o transplante entre ratos e camundongos, que evolutivamente são espécies consideradas mais próximas. Outro avanço significativo da técnica do transplante de espermatogônias foi o sucesso do transplante de células germinativas criopreservadas (Avarbock et al., 1996) e cultivadas (Brinster & Nagano, 1998; Nagano et al., 1998). Assim, com o congelamento e armazenamento de células germinativas, é possível preservar indefinidamente linhagens de células espermatogênicas de espécies em extinção, animais experimentais valiosos ou animais domésticos de alto valor zootécnico. Esta técnica também tem sido utilizada para restaurar a espermatogênese em camundongos inférteis WW^v (Ogawa et al., 2000), ou restaurar a fertilidade do camundongo SI/SI transplantando células de Sertoli de um camundongo normal (Shinohara et al., 2003). Mesmo com este enorme potencial de utilização, deve ser ressaltado que a eficiência do transplante é ainda relativamente baixa, merecendo, dessa forma, ser investigada mais acuradamente (Griswold et al., 2001; Aponte et al., 2005; McLean, 2005; Ehmcke et al., 2006).

Recentemente, vários estudos obtiveram sucesso no transplante singênico de animais de interesse zootécnico, como caprinos (Honaramooz et al., 2003 e 2003a), ovinos (Rodriguez-Sosa et al., 2006 e 2009), bovinos (Izadyar et al., 2003; Herrid et al., 2006), suínos (Mikkola et al., 2006), bem como em macacos (Schlatt et al., 2002; Hermann et al., 2007) que em tese são modelos experimentais para humanos. Nestes experimentos, as células germinativas foram marcadas para acompanhamento do desenvolvimento das mesmas no receptor com PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker) (Honaramooz et al., 2003a; Herrid et al., 2006); CFDA-SE (Carboxy Fluorescein Diacetate Succinyl Diester) (Herrid et al., 2006, Rodriguez-Sosa et al., 2006); DBA (Dolichos biflorus agglutinin) (Izadyar et al., 2003) e BrdU (Bromodeoxy-uridin) (Schlatt et al., 2002). Outros estudos utilizaram ainda animais transgênicos (Honaramooz et al., 2003a) ou animais que apresentavam defeito na espermatogênese (Mikkola et al., 2006). Os transplantes em animais de grande porte, diferentemente dos transplantes feitos em camundongos, que eram animais imunodeficientes (“nude mice”

ou SCID), foram feitos em animais considerados imunocompetentes. O sucesso do transplante em animais imunocompetentes pode estar associado à barreira formada pela célula de Sertoli no compartimento adluminal, o qual protegeria as células espermatogênicas após a ocorrência da meiose. Esta hipótese foi corroborada em estudos de camundongos que apresentavam deleção genética para as proteínas de junção de oclusão celular, como ocudinas (Saitou et al., 2000), claudinas 11 (Gow et al., 1999) e claudinas 5 (Morrow et al., 2009), os quais mostravam túbulos seminíferos formados somente por células de Sertoli. A barreira de célula de Sertoli ou barreira hematotesticular foi tema de recente revisão (Lui & Cheng, 2007). Entretanto, a proteção imunológica observada nos testículos não é conferida somente pela barreira da célula de Sertoli, uma vez que conforme é conhecido, as espermatogônias transplantadas nos lume dos túbulos seminíferos migram após determinado período de tempo para o compartimento basal, próximo à membrana basal, sem a proteção da barreira formada pela célula de Sertoli. Dessa forma, o CD95, sintetizado pela célula de Sertoli, é candidato à imunoproteção observada no testículo (Bellgrau et al., 1995), uma vez que provavelmente provoca apoptose em linfócitos T. Atualmente, o ambiente imunoprivilegiado observado no testículo é tido como multifatorial, envolvendo a atuação de andrógenos na modulação da resposta imune (Fijak & Meinhardt 2006).

Antes do transplante, o isolamento das células germinativas é realizado através de modificação do procedimento relatado por Bellvé et al. (1977), no qual as células germinativas do animal doador são coletadas utilizando-se protocolo de digestão enzimática dupla (colagenase associado com hialuronidase e tripsina). Após lavagem em meio de cultura de rotina (Dulbecco Modified Eagle Medium – DMEM), as células espermatogênicas são ressuspensas e diluídas em concentrações consideradas adequadas ($\sim 1 \times 10^7/\text{mL}$), sendo as mesmas transplantadas diretamente nos túbulos seminíferos através de micropipetas ($\sim 50 \mu\text{m}$ de diâmetro) (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Clouthier et al., 1996), ou na *rete testis* e nos ductos eferentes (Ogawa et al., 1997). Em animais de grande porte, foi demonstrado que a melhor via de transplante é através da *rete testis* localizada na região do mediastino testicular (Schlatt et al., 1999; Honaramooz et al., 2002) ou através da rede extratesticular, localizada entre a rede intratesticular e os ductos eferentes situados próximos à região da cabeça do epidídimo (Rodríguez-Sosa et al., 2006 e 2009). Para monitorar a viabilidade celular, bem como o percentual de túbulos seminíferos preenchidos com a suspensão celular, utiliza-se o azul de tripan.

O receptor ideal para o transplante de espermatogônias é o testículo cujos túbulos seminíferos contêm somente células de Sertoli normais. Assim, por apresentarem células de Sertoli normais e completamente diferenciadas, os camundongos W/W^v constituem excelente modelo experimental para serem utilizados como receptor (Kurohmaru et al., 1992). Da mesma forma, o camundongo homocigoto mutante Luxoid (lu/lu), nos quais ocorre a perda da capacidade de autorrenovação das células tronco (controlado pelos genes Plzf), e que possui células de Sertoli normais, apresenta-se também como receptor viável para transplantes (Buaas et al. 2004). Outros tipos de receptores com espermatogênese completa podem também serem empregados para o transplante. No entanto, antes do transplante, estes animais devem ter sua espermatogênese endógena deprimida. Com este objetivo, os mesmos são tratados com a droga quimioterápica busulfan cerca de um mês antes do transplante (Brinster & Zimmermann, 1994). Embora a dosagem de busulfan seja muito variada nas diferentes espécies, ou mesmo linhagens, a dosagem efetiva para destruir as células espermatogênicas em camundongos é de aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal. No entanto, mesmo com esta dosagem alta, nem todas as espermatogônias tronco são destruídas (Bucci & Meistrich, 1987). Desta forma, parte da espermatogênese endógena pode ainda persistir. Outra maneira de promover a depleção das células germinativas é a utilização da irradiação. O índice de depleção pode alcançar 99% (Creemers et al., 2002). Entretanto, esta irradiação, quando aplicada em todo o corpo do animal, compromete todos os sistemas auto-renováveis, semelhante às drogas quimioterápicas. Dessa forma, estudos mais recentes têm irradiado somente a região do testículo, mantendo-se assim a integridade física e funcional dos demais sistemas auto-renováveis. Conforme mostrado em vários trabalhos, um maior índice de depleção nas células germinativas foi obtido quando o testículo foi submetido à irradiação fracionada (duas doses) (de Ruiter-Bootsma et al. 1977; van Der Meer et al. 1993; Creemers et al., 2002).

Várias estratégias abordando tanto o doador quanto o receptor têm sido empregadas visando melhorar a eficiência do transplante. Dentre estas podem ser citadas a utilização de drogas que diminuem a concentração intratesticular de testosterona no doador (Dobrinski et al., 2001), a associação de tratamentos hormonais (estradiol e leuprolide) com o busulfan (Vecino et al., 2001) ou tratamento com busulfan em receptores na fase fetal (Brinster et al., 2003). Outras metodologias também são utilizadas com o objetivo de aumentar o número de células tronco a ser

transplantada, como o criptorquidismo experimental (Shinohara et al., 2000; Shinohara & Brinster, 2000), utilização de doadores e receptores mais jovens (Shinohara et al., 2000). Neste sentido, a utilização de camundongos doadores deficientes em vitamina A ou aqueles cujos testículos sofreram hipertermia (43° C por 15 minutos) (McLean et al., 2002), resultaram em maior eficiência do transplante, quantificada através do maior número de colônias e área com células espermatogênicas encontradas no receptor. Além dessas estratégias, o enriquecimento das espermatogônias tronco tem sido realizado utilizando-se marcadores de superfície, os quais aumentam consideravelmente a concentração de espermatogônias tronco, tais como; integrinas β_1^+ e α_6^+ , integrina α_v^- , CD9⁺, CD24⁺, Thy-1⁺, c-kit⁺, MHC-I⁺, Stra 8, Rho^{low} (intensidade baixa de rodamina 123 fluorescente), Ep-CAM⁺, EE2⁺, CDH1, GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor), GFR α -1, ERM, Plzf, Akt (Shinohara et al., 1999; Creemers et al., 2002; Kubota et al., 2003; Yomogida et al., 2003; Buaas et al., 2004; Aponte et al., 2005; Bugeaw et al., 2005; Chen et al., 2005; Khaira et al., 2005; McLean, 2005; Hess et al., 2006; Lee et al., 2007; Tokuda et al., 2007; Kokkinaki et al., 2009), aumentando bastante a eficiência do transplante no testículo do animal receptor, devido ao maior número de espermatogônias tronco injetadas.

Pelo fato das espermatogônias tronco inicialmente se autorrenovarem por cerca de dez a quinze dias após o transplante em roedores (Parreira et al., 1998; Nagano et al., 1999; Ohta et al., 2000), a partir de aproximadamente dois meses após o transplante é possível identificar a presença de espermatozóides originados de espermatogônias tronco doadoras (Parreira et al., 1998). Esta identificação pode ser feita através de transgenes marcadores (LacZ, da *E. coli*), que persistem por várias gerações sucessivas de animais e que se coram em azul através de técnicas específicas (X-gal) para a β -galactosidase (Brinster & Avarbock, 1994), pelo uso de animais que expressam e-GFP nas células germinativas (Ohta et al., 2000), ou ainda, pela utilização de camundongos transgênicos Ngn3/CreERTM, CAG-CAT-Z, CAG-CAT-EGFP (Araki et al., 1995; Kawamoto et al., 2000; Yoshida et al., 2004 e 2007). Além destes marcadores, as células germinativas, principalmente espermátides e espermatozóides de espécies diferentes, podem também ser prontamente distinguidas no epitélio seminífero e epidídimo do receptor através de suas características morfológicas, tais como, a forma e o grau de condensação da cabeça da espermátide, e o posicionamento das organelas dentro das células (Russell et al., 1996; França & Russell, 2000). Quando não é possível utilizar animais transgênicos e/ou marcadores morfológicos, o corante fluorescente

PKH26 tem sido usado como alternativa para acompanhar o desenvolvimento das células transplantadas no receptor (Honaramooz et al., 2002 e 2003a; Herrid et al., 2006; Lacerda et al., 2006 e 2008).

Referências bibliográficas

Almeida FFL, Leal MC, França LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). Biol Reprod 2006; 75:792-9.

Amann RP, Almquist JO. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. J Dairy Sci 1962; 45:774-81.

Aponte PM, Van-Bragt MA, De-Rooij DG, Van-Pelt AMM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. APMIS 2005; 113:727-42.

Araki K, Araki M, Miyazaki J, Vassalli P. Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:160-164.

Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. Nat Med 1996; 2:693-6.

Barroca V; Lassalle B; Coureuil M; Louis JP; Page FL; Testart J; Allemand I; Riou L; Fouchet P. Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*. Nat Cell Biol 2009; 11(2):190-6.

Baudi DLK, Jewgenow K, Pukazhenthil BS, Spencoski KM, Santos AS, Reghelin ALS, Candido MV, Javorouski ML, Müller G, Morais RN. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive *in vitro* binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). Theriogenology 2008; 69:204-211.

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke, RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. Nature 1995; 377:630-2.

Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. J Cell Biol 1977; 74:68-85.

Brinster CJ; Ryu BY; Avarbock MR; Karagenc L; Brinster RL; Orwig KE. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. Biol Reprod 2003; 69:412-420.

Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11303-7.

Brinster RL, Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(4):401-9.

Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11298-302.

Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296:2174-75.

Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science* 2007; 316:404-5.

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; 36:647-652.

Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe VY, Pholpramool C, Orwig KE, Schlatt S. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes¹. *Biol Reprod* 2005; 73:1011-1016.

Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987; 178:259-68.

Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao G-Q, Arber S, Kurpios N, Murphy TL, Cheng AM, Hassell JA, Chandrashekar V, Hofmann MC, Hess RA, Murphy KM. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 2005; 436:1030-1034.

Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LD. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod* 2001; 65:1179-85.

Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russel LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 2003; 126:669-680.

CITES [Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora]. Appendices I, II and III. 2009, p. 6. CITES website oficial (www.cites.org) mantido pela CITES Secretariat.

Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996; 381:418-21.

Costa GMJ, Chiarini-Garcia H, Morato RG, Alvarenga RLLS, França LR. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology* 2008; 70:1136-1146.

Courot M, Hochereau-de Reviers MT, Ortavant R. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, (eds.), *The Testis*. New York: Academic Press, 1970, pp.339-432.

Creemers LB, Meng X, den Ouden K, Van Pelt AM, Izadyar F, Santoro M, Sariola H, de Rooij DG. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod* 2002; 66:1579-84.

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; 21:776-98.

de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001; 121:347-354.

de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 2009; 72:580-585.

de Ruiter-Bootsma AL, Kramer MF, de Rooij DG, Davids JAG. Survival of spermatogonial stem cells in the mouse after split-dose irradiation with fission neutrons of 1-MeV mean energy or 300 kV X rays. *Radiat Res* 1977; 71:579-592.

Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57:270-9.

Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 61:1331-39.

Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster, RL. Effect of the GnRH-agonist leuprolide on colonization of recipient testes by donor spermatogonial stem cells after transplantation in mice. *Tissue Cell* 2001; 33(2):200-7.

Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11287-9.

Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 2006; 12 (3):275-282.

Eizirik E, Bonatto SL, Johnson WE, Crawshaw Jr. PG, Vié JC, Brousset DM, O'Brien SJ, Salzano FM. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial dna control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae). *J Mol Evol* 1998; 47:613-624.

Fijak M & Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev* 2006; 213:66-81.

França LR & Cardoso FM. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell* 1998; 30(5):573-582.

França LR & Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003; 68:1554-1561.

França LR & Russell LD. Spermatogonial transplantation in mammals. *Ann Rev Biomed Sci* 2000; 2:61-76.

França LR & Russell LD. The Testis of domestic animals. In: *Male Reproduction*. Martínez-García F, Regadera J, eds. Churchill Livingstone, Madrid, Spain, 1998:197-219.

França LR, Avelar GF, Almeida FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals, with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63:300-18.

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

França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis. *Biol Reprod* 1998; 59:1371-7.

França LR, Silva Jr VA, Chiarini-Garcia H, Garcia SK, Debeljuk L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 2000; 63:1629-1636.

Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell* 1999; 99:649-659.

Griswold MD, McLean D, Russell LD. Promise and limitations of germ cell transplantation in the testis. *J Androl* 2001; 22:713-7.

Hausler CL & Russell LD. Prospects for spermatogonial transplantation in livestock and endangered species. In: *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Gagnon C, ed. Cache River Press, Vienna, Il, 1999:37-45.

Hermann BP, Sukhwani M, Lin C-C, 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; 25:2330-2338.

Herrid M, Vignarajan S, Davey R, Dobrinski I, Hill JR. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction* 2006; 132:617-624.

Hess RA & França LR. Spermatogenesis. Cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY, editor. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Landes Bioscience, 2007, pp.1-15.

Hess RA, Cooke PS, Bunick D, Kirby JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli cell and germ cell number. *Endocrinology* 1993; 132:2607-13.

Hess RA, Cooke PS, Hofmann MC, Murphy MK. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle* 2006; 5(11):1164-1170.

Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev* 2003; 64:422-428.

Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I. Fertility and Germline Transmission of Donor Haplotype Following Germ Cell Transplantation in Immunocompetent Goats. *Biol Reprod* 2003a; 69:1260-1264.

Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod* 2002; 66:21-28.

Izadyar F, Creemers LB, Van Dissel-Emiliani FMF, Van Pelt AMM, de Rooij DG. Spermatogonial stem cell transplantation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:21-6.

Izadyar F, DenOuden K, Stout TAE, Stout J, Coret J, Lankveld DPK, Spoormakers TJP, Colenbrander B, Oldenbroek BJK, Van der Ploeg KD, Woelders H, Kal HB, de Rooij DG. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2003; 126:765-774.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 08 December 2009.

Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, Sano S, Kondoh G, Takeda J, Tabayashi K, Miyazaki J. A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett* 2000; 470:263-268.

Khaira H, Mclean D, Ohi DA, Smith GD. Spermatogonial stem cell isolation, andrology lab corner storage, and transplantation. *J Androl* 2005; 26:442-450.

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):707-17.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(11):6487-6492.

Kurohmaru M, Kanai Y, Hayashi Y. A cytological and cytoskeletal comparison of Sertoli cells without germ cell and those with germ cells using the W/W^V mutant mouse. *Tissue Cell* 1992; 24(6):895-903.

Lacerda SMSN, Batlouni SR, Assis LH, Resende FM, Campos-Silva SM, Silva RC, Segatelli TM, França LR. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybiium, Intern J Ichthyol* 2008; 32(2):115-118.

Lacerda SMSN, Batlouni SR, Silva SBG, Homem CSP, França LR. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Animal Reproduction* 2006; 3(2):146-159.

Leal MC & França LR. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod* 2006; 74:616-24.

Leblond CP & Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 1952; 55:548-584.

Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Kimura T, Nakano T, Ogura A, Shinohara T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* 2007; 134:1853-1859.

Lucas B, Fields C, Hofmann MC. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87:35-42.

Lui WY & Cheng CY. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis – A molecular and biochemical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18:299-311

Machado, ABM; Drummond, GM; Paglia, AP. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF: Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente, Fundação Biodiversitas, 2008, pp.785-786.

McLean DJ, Johnston DS, Russell LD, Griswold MD. Germ cell transplantation and the study of testicular function. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(1):16-21.

McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod* 2002; 66:1374-1379.

McLean DJ. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res* 2005; 322:21-31.

Meachem S, Von Schönfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cell with a great perspective. *Reproduction* 2001; 121:825-834.

Mikkola M, Sironen A, Kopp C, Taponen J, Sukura A, Vilkki J, Katila T, Andersson M. Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. *Reprod Domest Anim* 2006; 41:124-128.

Morais RN, Mucciolo RG, Gomes ML, Lacerda O, Moraes W, Moreira N, Graham LH, Swanson WF, Brown JL. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 2002; 57(8):2027-41.

Morrow CMK, Hostetler CE, Griswold MD, Hofmann MC, Murphy KM, Cooke PS, Hess RA. ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood–testes barrier function and testicular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1120: 144-151.

Morrow CMK, Tyagi G, Simon L, Carnes K, Murphy KM, Cooke PS, Hofmann MC, Hess RA. Claudin 5 expression in mouse seminiferous epithelium is dependent upon the transcription factor ets-variant 5 and contributes to blood-testis barrier function. *Papers in press. Biol Reprod* 2009. DOI:10.1095.

Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Reprod* 1999; 60:1429-36.

Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell* 1998; 30:389-97.

Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol Reprod* 2001; 64:1409-1416.

Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell* 2007; 12:195-206.

Nascimento HF, Drumond AL, França LR, Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int J Androl* 2009; 32(5):486-97.

Nowak RM. Walker's mammals of the world. 6ed., v.2. London: Johns Hopkins University Press 1999; p.1053-1062.

O'Brien SJ & Johnson WE. Big cat genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005; 6:407-29.

O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, Pontius J, Pecon-Slattery J, Menotti-Raymond, M. State of cat genomics. *Trends Genet* 2008; 24(6):268-279.

O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Yuhki N. The feline genome project. *Annu Rev Genet* 2002; 36:657-86.

O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer L, Colly L, Evermann IF, Bush M, Wildt DE. Genetics basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 1985; 277:1428-1434.

Oatley JM & Brinster RL. Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24:263-86.

Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster R. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41:111-22.

Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med* 2000; 6:29-34.

Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 60:515-21.

Ohta H, Yomogida K, Yamada S, Okabe M, Nishimune Y. Real-time observation of transplanted 'green cells': proliferation and differentiation of stem cells. *Dev Growth Differ* 2000; 42:105-12.

Parreira GG, Ogawa T, Avarbock MR, França LR, Brinster RL, Russell LD. Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod* 1998; 59:1360-70.

Paz RCR, Eduardo Dias EA, Adania CH, Barnabe VH, Barnabe RC. Ovarian response to repeated administration of alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrinus (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology* 2006; 66:1787-1789.

Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenti B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* 2006; 66:37-48.

Pukazhenti BS, Neubauer K, Jewgenow K, Howard J, Wildt DE. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 2006; 66:112-121.

Raverot G, Weiss J, Park SY, Hurley L, Jameson JL. Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol* 2005; 283:215-225.

Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology* 2006; 66:2091-2103.

Rodriguez-Sosa JR, Silvertown JD, Foster RA, Medin JA, Hahnel A. Transduction and transplantation of spermatogonia into the testis of ram lambs through the extra-testicular rete. *Reprod Domest Anim* 2009; 44(4):612-20.

Roelke ME, Marterson JS, O'Brien SJ. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Curr Biol* 1993; 3:340-350.

Russell LD & Griswold MD. The Sertoli cell. Cache River Press, Clearwater, FL, 1993, 801p.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, FL, 1990. 286p.

Russell LD, França LR, Brinster RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J Androl* 1996; 17:603-14.

Russell LD, Sinha-Hikim AP, Ghosh S, Bartke A. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: Bartke A (ed.). *Function of somatic cells in the testis*. Norwell: Springer-Verlag, 1994. Cap. 3. p.55-83.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000; 11:4131-4142.

Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Hum Reprod* 2002; 17:55-62.

Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF, Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod* 1999; 14:144-50.

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; 140:5894-5900.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994:1363-1434.

Shinohara T & Brinster RL. Enrichment and transplantation of spermatogonial stem cells. *Int J Androl* 2000 Suppl 2; 23:89-91.

Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. β_1 - and α_6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:5504-9.

Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. *Dev Biol* 2000; 220:401-11.

Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biol Reprod* 2003; 68:1064-1071.

Silva AR, Morato RG, Silva DML. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim Reprod Sci* 2004; 81(1-2):159-175.

Swanson WF & Brown JL. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83:21-34.

Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* 2007; 76:130-141.

van Der Meer Y, Huiskamp R, David JAG, de Rooij DG. Differential effects of fractionated X irradiation on mouse spermatogonial stem cells. *Radiat Res* 1993; 135:222-228.

Vecino P, Uranga JA, Arechaga J. Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. *Protoplasma* 2001; 217:191-8.

World wide fund for nature (WWF). Living planet report 2008, 45p. website oficial (www.wwf.org).

Yomogida K, Yagura Y, Tadokoro Y, Nishimune Y. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol Reprod* 2003; 69:1303-7.

Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. *Science* 2007; 317(5845):1722-1126.

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; 269:447-458.

CAPÍTULO 1

ESTEREOLOGIA DO TESTÍCULO, DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA EM JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis*)

Resumo

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*), à semelhança da maioria dos felídeos é uma espécie ameaçada de extinção. Para agravar essa situação, o conhecimento da biologia reprodutiva da jaguatirica é muito limitado. O transplante de espermatogônia tronco é uma técnica efetiva para se investigar a espermatogênese e a biologia da espermatogônia tronco nos mamíferos. O gato doméstico (*Felis catus*) é um modelo em potencial de receptor para a preservação e a propagação de plasma germinal de felídeos em risco ou ameaçados de extinção. A caracterização morfológica das células germinativas, bem como o conhecimento da duração do ciclo do epitélio seminífero, são ferramentas em potencial para se acompanhar o desenvolvimento das células germinativas transplantadas. Nosso principal objetivo foi o estudo dos aspectos básicos da estrutura do testículo, particularmente a espermatogênese da jaguatirica. Quatro machos adultos foram utilizados. Após a orquiectomia unilateral, as amostras dos testículos foram preparadas com técnicas de rotina para análises histológicas, estereológicas e autoradiográficas. O peso do testículo e o índice gonadossomático foram de $11 \pm 0,6$ gr e $0,16 \pm 0,01\%$, respectivamente, ao passo que o percentual ocupado pelos túbulos seminíferos e pelas células de Leydig no parênquima testicular foi de $83 \pm 1,6$ e $10 \pm 1,5\%$, respectivamente. Baseado no sistema acrossômico, oito estádios foram caracterizados e a morfologia das células germinativas foi similar à do gato doméstico. A duração de um ciclo espermatogênico foi de $12,5 \pm 0,4$ dias, ao passo que a duração total da espermatogênese foi de $56,3 \pm 1,9$ dias. O volume individual da célula de Leydig foi de $2.500 \mu\text{m}^3$, enquanto o número de células de Leydig e de Sertoli por grama foi de $38 \pm 5 \times 10^6$ e $46 \pm 3 \times 10^6$, respectivamente. O número de espermátócitos por célula de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli) foi de aproximadamente 4,5 e a produção espermática diária por grama de testículo foi de $18,3 \pm 1 \times 10^6$. O conhecimento obtido no presente estudo pode auxiliar na preservação da jaguatirica, através da utilização do testículo do gato doméstico para gerar e propagar o genoma desta espécie. Palavras chave: testículo, estereologia, eficiência espermática, duração do ciclo espermatogênico, jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Abstract

Similar to most wild felids, the ocelot (*Leopardus pardalis*) is an endangered species. Aggravating this situation, knowledge on the reproductive biology of the ocelot is very limited. Germ cell transplantation is an effective technique for investigating spermatogenesis and stem cell biology in mammals. The domestic cat is a potential recipient model for preserving and propagating male germplasm from threatened or endangered wild felids. The morphological characterization of germ cells and knowledge on cycle length are potential tools for tracking the development of transplanted germ cells. Our goal was to investigate basic aspects related to testis structure, particularly spermatogenesis, in the ocelot. Four adult males were used. After unilateral orchiectomy, testis samples were routinely prepared for histological, stereological and autoradiographic analyses. Testis weight and the gonadosomatic index were $11\pm 0.6\text{g}$ and $0.16\pm 0.01\%$, respectively, whereas the volume density of seminiferous tubules and Leydig cells was 83 ± 1.6 and $10\pm 1.5\%$, respectively. Based on the acrosomic system, eight stages of spermatogenesis were characterized and germ cell morphology was very similar to that of domestic cats. Each spermatogenic cycle lasted 12.5 ± 0.4 d and the entire spermatogenic process lasted 56.3 ± 1.9 d. Individual Leydig cell volume was $2500\ \mu\text{m}^3$, whereas the number of Leydig and Sertoli cells per testis gram was $38\pm 5\times 10^6$ and $46\pm 3\times 10^6$, respectively. Approximately 4.5 spermatids were found per Sertoli cell, whereas daily sperm production per testis gram was $18.3\pm 1\times 10^6$. The knowledge obtained in this study could be very useful to the preservation of the ocelot using domestic cat testes to generate and propagate the ocelot genome.

Key words: testis; stereology; spermatogenic efficiency; spermatogenic cycle length; ocelot (*Leopardus pardalis*).

1. Introdução

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é um gato de tamanho médio (7–15,8 kg), que ocupa uma grande variedade de ecossistemas, desde florestas úmidas até a caatinga (Eizirik et al., 1998). À semelhança da grande maioria dos felídeos, as jaguatiricas são consideradas como espécie ameaçada de extinção pela CITES e outros autores (O'Brien et al., 2005; Pelican et al., 2006; Baudi et al., 2008). No Brasil, as populações de *Leopardus pardalis* encontradas fora da bacia Amazônica são consideradas como vulneráveis a extinção (Machado et al., 2008). Conforme ocorre com outras espécies, a perda da diversidade genética representa um sério risco para a conservação de felídeos selvagens ameaçados de extinção (Kim et al., 2006). Embora o conhecimento da biologia reprodutiva seja um parâmetro crucial para a preservação de espécies ameaçadas de extinção, existem poucas informações sobre a função testicular em jaguatiricas (Morais et al., 2002; Baudi et al., 2008).

A caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e a estimativa da duração do processo espermatogênico, são fundamentais para determinar a eficiência espermática, bem como para permitir estudos comparativos entre diferentes espécies. A duração total da espermatogênese requer aproximadamente 4,5 ciclos e varia de 30 a 75 dias nos mamíferos já estudados (França & Russell; 1998; Hess & França, 2007). Esta duração geralmente é constante para uma determinada espécie (Clermont, 1972) e está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998).

O transplante de espermatogônias tronco é uma técnica que foi desenvolvida recentemente e apresenta alto potencial para estudos envolvendo a biotecnologia, produção de animais transgênicos e a preservação de estoque genético de animais zootécnicos valiosos ou espécies ameaçadas de extinção (Dobrinski, 2005; Khaira et al., 2005; Brinster, 2007; Dobrinski & Travis, 2007). Atualmente, estamos desenvolvendo estudos em nosso laboratório com transplante de espermatogônias tronco em felídeos, utilizando o gato doméstico (*Felis catus*) como receptor, sendo nosso principal objetivo utilizar esta espécie para preservar o estoque genético de espécies ameaçadas de extinção, inclusive a jaguatirica. Para tal finalidade, o conhecimento da função testicular e da duração do ciclo do epitélio seminífero nesta espécie é fundamental.

Pelo fato de existirem poucos trabalhos na literatura relacionados à biologia reprodutiva em jaguatirica (Morais et al., 2002; Baudi et al., 2008), o principal objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de estudo morfológico detalhado e

abrangente do testículo, bem como determinar a duração do processo espermatogênico e a eficiência da célula de Sertoli em jaguatiricas sexualmente maduras.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Quatro jaguatiricas (com idade entre 2,5 e 3,5 anos) pesando $13,8 \pm 1$ kg foram utilizadas. Esses animais foram mantidos no abrigo Brigitte Johnson, localizado na cidade de Belo Horizonte (19°55'15"S; 43°56'16"W), estado de Minas Gerais, Brasil. Como não foram encontradas diferenças sazonais significativa na produção espermática em jaguatiricas mantidas em cativeiro (Morais et al., 2002), os testículos foram coletados no presente estudo durante a estação de inverno (julho). Os animais foram contidos e submetidos à anestesia geral, utilizando uma associação de cloridrato de xilasina (Vetbrands, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, São Paulo, Brasil) e ketamina (König, König do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil) usando-se a dose de 1,1 e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Após a orquiectomia unilateral, os testículos foram separados dos epidídimos, pesados e cortados longitudinalmente (com uma lâmina de barbear) em pequenos fragmentos, os quais foram fixados por imersão em glutaraldeído 4% por 24 horas. Os fragmentos (com 2 a 3 mm de espessura) foram preparados e incluídos em glicol metacrilato utilizando-se técnicas de rotina para avaliação histológica, morfométrica e autoradiográfica. Com o objetivo de se estudar a morfologia dos espermatozoides das jaguatiricas, estas células foram coletadas do epidídimo e o esfregaço foi preparado utilizando-se técnicas de rotina para avaliação e comparação com os esfregaços de onças pintadas e gatos domésticos já disponíveis em nosso laboratório. Todos os procedimentos cirúrgicos foram efetuados por veterinário qualificado, sendo conduzidos de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG; protocolo nº 036/03) e autorizado pelo IBAMA (autorização nº-16714-1).

2.2. Injeção de timidina e preparação do tecido

Com o objetivo de se estimar a duração do processo espermatogênico, antes da orquiectomia unilateral, uma injeção intratesticular (~0,2 mL) de timidina triciada (thymidine [methyl-3H], com atividade específica de 82.0 Ci/mmol, Amersham, Life

Science, England) – um marcador específico para síntese de DNA – foi efetuada próximo à região da cauda do epidídimo em dois animais. Para cada animal, dois intervalos de tempo (24 dias e 1 hora, 28 dias e 1 hora) foram considerados após a injeção de timidina triciada. Os fragmentos dos testículos (com 2 a 3 mm de espessura) foram coletados na região onde foi efetuada a injeção e os fragmentos foram fixados e incluídos em resina conforme já descrito. Para as análises autoradiográficas, as lâminas histológicas com secções (4 μm) dos fragmentos dos testículos foram mergulhadas em emulsão fotográfica (Kodak NTB-2, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) a 43 – 45 °C. Após a secagem por cerca de uma hora a 25 °C, as lâminas foram colocadas numa caixa selada escura e armazenadas em geladeira (4 °C), por aproximadamente quatro semanas. Subsequentemente, estas lâminas foram reveladas em solução Kodak D-19 na temperatura de 15 °C (Bundy, 1995) e posteriormente coradas com azul de toluidina. As análises foram efetuadas sob microscopia de luz, com o objetivo de se detectar a célula germinativa mais avançada marcada (nos três intervalos de tempo utilizados) pela timidina triciada. As células foram consideradas marcadas quando apresentava de quatro a cinco grãos de timidina no núcleo, na presença de “background” baixo ou moderado.

2.3. Estereologia

As proporções dos diversos componentes testiculares foram estimadas utilizando-se retículo com 441 interseções (pontos), acoplado à ocular de um microscópio de luz. Para cada animal foram analisados 15 campos (aumento de 400X) escolhidos aleatoriamente, perfazendo-se um total de 6615 pontos. O diâmetro do túbulo seminífero e a altura do epitélio foram medidos utilizando-se ocular micrométrica de 10X, acoplada à objetiva de 100X, resultando em aumento final de 1000X. Foram medidos trinta túbulos arredondados, escolhidos ao acaso, para cada animal. A altura do epitélio foi obtida do mesmo túbulo utilizado para a medida do diâmetro tubular. O comprimento total do túbulo seminífero (metros) foi obtido pela divisão do volume total do túbulo seminífero pelo raio ao quadrado do túbulo multiplicado por π (Johnson & Neaves, 1981).

2.4. Estádios do ciclo do epitélio seminífero

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico e a morfologia do núcleo das espermátides

em desenvolvimento (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990). Semelhante à onça e ao gato doméstico (Costa et al., 2008), a jaguatirica também apresentou o ciclo do epitélio seminífero composto por oito estádios. As frequências relativas de cada um dos oito estádios caracterizados foram determinadas avaliando-se 150 secções transversais de túbulos seminíferos, por animal, em aumento de 400X. As medidas dos ângulos dos acrossomas sobre a superfície nuclear foram obtidas em 15 células germinativas (por animal e por estágio do ciclo) em aumento de 1000X.

2.5. Duração do ciclo do epitélio seminífero

As secções histológicas avaliadas neste estudo foram aquelas que apresentaram melhor qualidade e o maior número de túbulos em secções transversais. A duração do ciclo espermatogênico foi estimada com base nas frequências relativas dos diferentes estádios e das células germinativas marcadas mais avançadas encontrada após a injeção de timidina triciada (nos diferentes tempos) em dois animais. A duração total do processo espermatogênico levou em conta que são necessários 4,5 ciclos espermatogênicos para que este processo seja concluído, desde espermatogônias do tipo A até a espermição (Amann & Schanbacher 1983). Como o volume do núcleo do espermatócito primário em paquíteno cresce de forma contínua durante a prófase meiótica e estas células estão presentes em quase todos os estádios do ciclo (França & Russell, 1998; Neves et al., 2002), o tamanho dos seus núcleos foi utilizado como ponto de referência, com o objetivo de se determinar de forma mais precisa a localização da célula germinativa marcada mais avançada.

2.6. Contagem e razões entre números celulares

Todos os núcleos das células germinativas e os nucléolos das células de Sertoli presentes no estágio V do ciclo foram contados em dez secções transversais do túbulo seminífero com perfis arredondados, que foram escolhidos ao acaso para cada animal. Os números celulares obtidos foram corrigidos para o diâmetro nuclear ou nucleolar e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann & Almquist (1962). Dessa forma, os diâmetros de 10 núcleos ou nucléolos foram medidos para cada tipo celular analisado. As razões celulares foram obtidas a partir das contagens corrigidas obtidas no estágio V. O número total de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal do túbulo seminífero e do comprimento total de

túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau et al., (1978). A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo (eficiência espermática) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\text{Número total de células de Sertoli por testículo} \times \text{ICS} \times \text{frequência do estágio V (\%)}}{\text{Duração do estágio V (dias)}}$$

onde: ICS = Índice de célula de Sertoli ou eficiência espermática (França, 1992). O cálculo do volume individual das células de Leydig foi obtido a partir da estimativa do volume nuclear e pela proporção ocupada pelo núcleo e o citoplasma. O diâmetro nuclear médio destas células foi obtido com o auxílio de ocular micrométrica 10X acoplada à objetiva de 100X, resultando em aumento final de 1000X. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram o mais esférico possível e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. Os valores encontrados foram expressos em micrômetros cúbicos e obtidos pela seguinte fórmula: $\frac{4}{3}\pi R^3$, na qual R = diâmetro nuclear/2. Com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre o núcleo e o citoplasma, foi empregado um retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 400X. Mil pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig foram contados por animal. O número total de células de Leydig por testículo foi estimado a partir do conhecimento do volume individual das células de Leydig e o volume ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular.

3. Resultados

3.1. Dados biométricos e densidade volumétrica do testículo

Todos os dados estão apresentados na Tabela 1. A média (\pm EPM) do peso testicular para as jaguatiricas adultas foi de $11 \pm 0,6$ grama, apresentando um índice gonadossomático de $0,16 \pm 0,01\%$. A densidade volumétrica dos túbulos seminíferos e das células de Leydig foi de $83,2 \pm 1,6$ e $9,8 \pm 1,5\%$, respectivamente. Dessa forma, as células de Leydig ocuparam aproximadamente 60% do compartimento intertubular. O diâmetro tubular médio e a altura do epitélio foram de 252 ± 3 e 86 ± 3 μm , respectivamente. O percentual médio ocupado pela túnica albugínea foi de aproximadamente $20 \pm 0,02\%$ (dado não mostrado). Com base no volume do parênquima testicular (peso do testículo menos o peso da albugínea), e o volume

ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e o diâmetro tubular, o comprimento tubular foi de $16,7 \pm 0,4$ e 150 ± 13 m por grama de testículo e por testículo, respectivamente (Tabela 1). A morfologia observada para os espermatozoides obtidos do epidídimo da jaguatirica foi similar à morfologia previamente determinada para a onça pintada e para o gato doméstico (dado não mostrado).

3.2. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa dos estádios

Os oito estádios caracterizados baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico (Fig. 1) foram similares àqueles previamente descritos para a onça pintada e para o gato doméstico (Costa et al., 2008), e os mesmos estão descritos abaixo. Com o objetivo de melhor caracterizar estes estádios, uma vez que a vesícula acrossômica ao se formar vai se espalhando na superfície do núcleo, os ângulos formados pelos acrossomas em desenvolvimento nas espermátides foram também medidos.

3.2.1. – Estádio I. Duas gerações de espermátides foram observadas, incluindo espermátides arredondadas e espermátides alongadas. Uma vez que o grânulo pré-acrossômico não pode ser visualizado neste estágio, através de microscopia de luz, as espermátides recém-formadas foram caracterizadas pela ausência destes grânulos acrossômicos. No entanto, o aparelho de Golgi perinuclear estava bastante evidenciado neste estágio. Alguns feixes de espermátides alongadas presentes neste estágio estavam localizados mais profundamente no epitélio seminífero, mais próximos da base do epitélio do que do lúmen. Os núcleos das espermatogônias do tipo A e intermediárias estavam localizados na base do túbulo. Espermatócitos jovens em fase de paquíteno encontravam-se entre as espermátides arredondadas e a membrana basal.

3.2.2. – Estádio II. As espermátides arredondadas iniciais usualmente apresentam duas pequenas vesículas nas quais somente ocasionalmente os grânulos pré-acrossômicos estavam presentes. No final deste estágio, os pequenos grânulos pré-acrossômicos coalesceram para formar uma grande vesícula acrossômica contendo um único grânulo acrossômico e esta vesícula se encontrava em contato com o núcleo. Os feixes de espermátides alongadas se moveram em direção ao lúmen dos túbulos. Os núcleos dos espermatócitos em paquítenos eram maiores do que os observados no estágio I e se localizavam um pouco mais distante da membrana basal. Espermatogônias do tipo B e do tipo A também estavam presentes neste estágio.

3.2.3. – Estádio III. A vesícula acrossômica se espalhou levemente sobre o núcleo durante este estágio e permaneceu arredondada. A vesícula acrossômica formou, neste

estádio, um ângulo de aproximadamente $55 \pm 4,3^\circ$ (variando de ~ 42 a $\sim 70^\circ$) sobre a superfície nuclear. Os feixes de espermátides alongadas se dissociaram e os núcleos das espermátides estavam localizados muito próximos do lúmen tubular. Espermatogônias do tipo A, espermátocitos em fase de paquíteno com núcleos maiores, espermátides arredondadas e espermatogônias do tipo B estavam também presentes neste estágio. Os núcleos das espermatogônias do tipo B foram caracterizados por apresentarem forma arredondada ou ovóide e pela presença de grande quantidade de heterocromatina.

3.2.4. – Estádio IV. Uma extensa vesícula acrossômica foi observada nas espermátides neste estágio. A vesícula acrossômica que se estendeu sobre o núcleo começou a se achatar no ponto de contato com o núcleo. Neste estágio, esta vesícula acrossômica formou um ângulo de aproximadamente $80 \pm 6^\circ$ (variando de ~ 60 a $\sim 97^\circ$) sobre a superfície nuclear. A principal característica deste estágio foi a localização das espermátides alongadas bem próximas da borda luminal sendo liberadas no lúmen dos túbulos seminíferos. Corpos residuais foram observados logo abaixo das espermátides alongadas. Os espermátocitos em fase de pré-leptóteno, originados das espermatogônias do tipo B estavam em contato com a membrana basal, foram outro tipo celular presente neste estágio. De forma geral, a morfologia nuclear das espermátides arredondadas, espermátocitos em fase de paquíteno e espermatogônias do tipo A foram semelhantes às descritas no estágio anterior.

3.2.5. – Estádio V. Os núcleos das espermátides ainda permaneciam arredondados e a vesícula acrossômica formou um ângulo de aproximadamente $100 \pm 10,2^\circ$ (variando de ~ 73 a 140°). Neste estágio foi observada somente uma geração de espermátides, as quais formavam várias camadas localizadas na parte superior do epitélio seminífero. Espermatogônias do tipo A raramente foram observadas. Duas gerações de espermátocitos primários foram ocasionalmente observadas – leptótenos, cujos núcleos estavam próximos à membrana basal; e paquítenos, localizados entre a camada de espermátocitos em leptóteno e as espermátides.

3.2.6. – Estádio VI. A razão entre o eixo mais longo ou longitudinal e o mais curto (linha transversal que atravessa o núcleo na zona equatorial) foi de aproximadamente $1,43 \pm 0,1$. O núcleo das espermátides começou seu processo de alongamento e a cromatina na espermátide jovem em alongamento se apresentou mais condensada do que no estágio anterior. Os espermátocitos primários encontravam-se na transição de leptóteno para zigóteno e os espermátocitos em fase de paquíteno mostravam núcleos

maiores do que os mostrados no estágio V. Espermatogônias do tipo A também foram observadas neste estágio.

3.2.7. – Estágio VII. O processo de alongamento das espermatídes estava completo neste estágio. A razão entre o eixo mais longo e o mais curto do núcleo foi $2,54 \pm 0,3$. O grau de condensação do núcleo (avaliado pela intensidade da coloração) aumentou durante a última fase deste estágio. As espermatídes alongadas iniciaram a formação de feixes, com suas cabeças (núcleos) orientadas em direção ao núcleo das células de Sertoli, usualmente localizados próximo à base dos túbulos. Os espermatócitos primários jovens apresentavam características de células em fase de zigóteno. Ao final deste estágio, os espermatócitos em paquítenos sofreram transição para a fase de diplóteno da prófase meiótica. Os núcleos das espermatogônias do tipo A foram mais frequentes e com aparência semelhante à descrita no estágio anterior.

3.2.8. – Estágio VIII. Os núcleos das espermatídes alongadas apresentavam forma semelhante à observada no estágio anterior. Quando avaliado pela afinidade pela coloração, a condensação no núcleo ainda está ocorrendo nesta fase. A presença de figuras meióticas da primeira e segunda divisão foi a principal característica deste estágio; desta forma, espermatócitos secundários e espermatídes arredondadas iniciais também foram vistas neste estágio. Os espermatócitos em zigóteno sofreram transição para espermatócitos em fase de paquíteno neste estágio. Os feixes de espermatídes alongadas estavam localizados no interior das criptas das células de Sertoli, próximo à porção média do epitélio seminífero. Espermatogônias do tipo A também foram observadas em grande número.

O percentual médio de cada um dos oito estágios do ciclo do epitélio seminífero caracterizados para a jaguatirica está representado na figura 1. O estágio II foi o menos frequente (5,2%), ao passo que o estágio IV, V e VII apresentaram frequências maiores (18 a 21%). As frequências dos estágios pré-meiótico (Estágio V–VII), meiótico (Estágio VIII) e pós-meiótico (Estádios I–IV) do ciclo foram de 51,1; 8,9 e 40%, respectivamente.

3.3. Duração do ciclo do epitélio seminífero

Os tipos de células germinativas marcadas após a injeção de timidina triciada nos diferentes períodos de tempo avaliados estão mostrados na Tabela 2; Figs. 2 e 3. Após aproximadamente 1 hora, as células germinativas marcadas mais avançadas foram espermatócitos em fase de pré-leptóteno ou células em transição de pré-leptóteno para

leptóteno (Fig. 2A e Fig. 3). Estas células foram encontradas no início do Estádio VI. Com base na média do diâmetro dos núcleos dos paquítenos, estas células percorreram aproximadamente 20% deste estágio em ambos os animais analisados e estavam localizadas no compartimento basal. Após 24 dias, as células marcadas foram espermátides arredondadas presentes no Estádio V, que percorreram 70% deste estágio. Após 28 dias, as células marcadas mais avançadas foram espermátides alongadas no Estádio I, as quais percorreram 40% deste estágio. Levando-se em consideração as células germinativas marcadas mais avançadas após as injeções de timidina triciada e a frequência dos estádios, a duração média do ciclo do epitélio seminífero para os dois animais investigados foi estimada em $12,5 \pm 0,4$ dias (Tabela 2). A duração dos vários estádios do ciclo foi determinada levando em conta a duração e o percentual de ocorrência de cada estágio. Assim, o estágio mais curto foi o estágio II (0,65 dias) e o mais longo foi o estágio V (2,66 dias) (Fig. 3). Como aproximadamente 4,5 ciclos são necessários para se completar o processo espermatogênico, a duração total da espermatogênese foi estimada em $56,3 \pm 1,9$ dias.

3.4. Morfometria do testículo

Os dados relacionados à morfometria do testículo para a jaguatirica estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. O índice meiótico (medida como o número de espermátides arredondadas produzidas por espermatócito primário em fase de paquíteno) foi de $2,9 \pm 0,1$. Portanto, houve uma perda celular de 30% durante a prófase meiótica. A eficiência da célula de Sertoli (estimada pelo número de espermátides arredondadas para cada célula de Sertoli) foi de $4,5 \pm 0,1$. O número de células de Sertoli por grama de testículo foi de $46 \pm 3 \times 10^6$, enquanto o número destas células por testículo foi de $419 \pm 54 \times 10^6$. Em relação à eficiência espermatogênica, a produção espermática diária por grama de testículo e por testículo foi de aproximadamente $18,3 \pm 1$ e $163 \pm 21 \times 10^6$, respectivamente. O valor médio do volume nuclear e tamanho das células de Leydig (Tabela 4) foi de 421 ± 16 e $2.522 \pm 172 \mu\text{m}^3$, respectivamente, ao passo que o número destas células por grama de testículo e por testículo foi de $38 \pm 5 \times 10^6$ e $300 \pm 20 \times 10^6$, respectivamente.

4. Discussão

Existem poucos dados na literatura relacionados à biologia reprodutiva da família Felidae, na qual encontramos alguns dos predadores mais eficientes da terra, que

atualmente se encontram ameaçados ou em risco de extinção (O'Brien et al., 2008). O presente estudo é o primeiro a reportar uma investigação estereológica e funcional detalhada da função testicular em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e, no nosso conhecimento, após o estudo sobre a onça pintada (*Panthera onca*) (Costa et al., 2008), a segunda investigação mais detalhada e abrangente relacionada aos aspectos histológicos e quantitativos do testículo em felídeos selvagens.

No presente estudo, os testículos foram coletados durante o período de inverno no Hemisfério Sul (Julho). Em estudo desenvolvido no Brasil com jaguatiricas adultas mantidas em cativeiro, Morais e colaboradores (2002) observaram aumento significativo da concentração de testosterona na primavera, seguido de aumento na produção espermática observada no verão (embora ainda não tenha sido significativa). Entretanto, neste estudo, as espécies investigadas (jaguaritica, gato do mato e gato do mato pequeno) foram capazes de reproduzirem normalmente durante todo o ano. Em comparação com os dados obtidos em nosso laboratório para onça pintada e gato doméstico (Tabela 5), o índice gonadossomático para a jaguaritica foi duas e três vezes maior, respectivamente, sugerindo assim que a jaguaritica apresenta uma estratégia reprodutiva diferente e/ou investe mais na reprodução. Apesar de exibir baixa eficiência da célula de Sertoli (número de espermátides suportadas por célula de Sertoli), a jaguaritica possui aproximadamente 50% mais células de Sertoli por grama de testículo do que o gato doméstico e a onça pintada, apresentando assim eficiência espermática (produção espermática diária por grama de testículo) ligeiramente maior do que os valores relatados na literatura para o gato doméstico e onça pintada. Também é importante ressaltar que a eficiência da célula de Sertoli observada na jaguaritica é uma das mais baixas encontradas nos mamíferos já estudados (Hess & França, 2007). Entretanto, a duração do ciclo espermatogênico na jaguaritica foi semelhante à encontrada para a onça pintada e mais longa do que os valores observados para o gato doméstico (Tabela 5), bem como para a maior parte das espécies estudadas (Hess & França, 2007).

Os estádios do ciclo do epitélio seminíferos nos mamíferos podem ser classificados com base nas modificações observadas na forma do núcleo da espermátide, ocorrência de divisões meióticas e o arranjo das espermátides no interior do epitélio germinativo (Courot et al., 1970; Berndtson, 1977; França & Godinho, 2003), ou ainda, com base no desenvolvimento do sistema acrossômico e morfologia das espermátides em desenvolvimento (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990;

Costa et al., 2008). Oito estádios foram caracterizados para a jaguatirica de acordo com o sistema acrossômico e a morfologia das células germinativas foi semelhante àquela já descrita para o gato doméstico (França & Godinho, 2003) e onça pintada (Costa et al., 2008). A morfologia dos espermatozóides na jaguatirica também foi similar à do gato doméstico. Dessa forma, o espermatozóide dessas duas espécies não pode ser prontamente distinguido através da morfologia.

A literatura sugere fortemente que a frequência dos estádios pré e pós-meióticos pode ser determinada filogeneticamente entre os membros de uma mesma família (França & Russell, 1998; Neves et al., 2002; Almeida et al., 2006). Por outro lado, a duração do ciclo do epitélio seminífero é geralmente considerada constante para uma determinada espécie (Clermont, 1972) e está sobre o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). Estudos recentes utilizando-se de técnicas de genética molecular demonstraram que a divergência filogenética entre a jaguatirica e o gato doméstico e entre a onça pintada e o gato é aproximadamente de dois a cinco milhões de anos, respectivamente (Johnson et al., 2006; Driscoll et al., 2007; O'Brien et al., 2008). Neste sentido, as frequências combinadas dos estádios pré e pós-meióticos encontrados para a jaguatirica foram próximos dos encontrados para o gato doméstico. Entretanto, as durações de um ciclo espermatogênico e da espermatogênese total apresentaram valores semelhantes aos obtidos para a onça pintada (Tabela 5).

Semelhante ao gato doméstico (França & Godinho, 2003), a túnica albugínea do testículo da jaguatirica é muito espessa, sendo o percentual ocupado pela albugínea maior do que os valores observados para maioria dos mamíferos já estudados (França & Russell, 1998), inclusive da onça pintada (Costa et al., 2008).

O diâmetro do túbulo seminífero e a altura do epitélio seminífero encontrados na jaguatirica foram semelhantes aos da maioria dos mamíferos já estudados (Setchell, 1994) e não divergiu dos valores observados para o gato doméstico (França & Godinho, 2003) e onça pintada (Costa et al., 2008). Por outro lado, os túbulos seminíferos no gato doméstico ocuparam quase 90% do parênquima testicular, ao passo que esses valores foram de aproximadamente 83% e 75% na jaguatirica e onça pintada, respectivamente (Tabela 5). Dessa forma, o comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo no gato doméstico foi quase 15% maior do que o da jaguatirica. O percentual de célula de Leydig na jaguatirica (Tabela 4) foi maior do que o verificado para a maioria dos mamíferos (Hess & França, 2007), incluindo-se os valores obtidos para o gato doméstico (França & Godinho, 2003). Entretanto, embora o tamanho da célula de

Leydig tenha sido um dos maiores encontrados nos mamíferos já estudados, o número destas células por grama de testículo foi semelhante ao observado para o gato doméstico e aproximadamente um terço dos valores descritos para a onça pintada (Tabela 5).

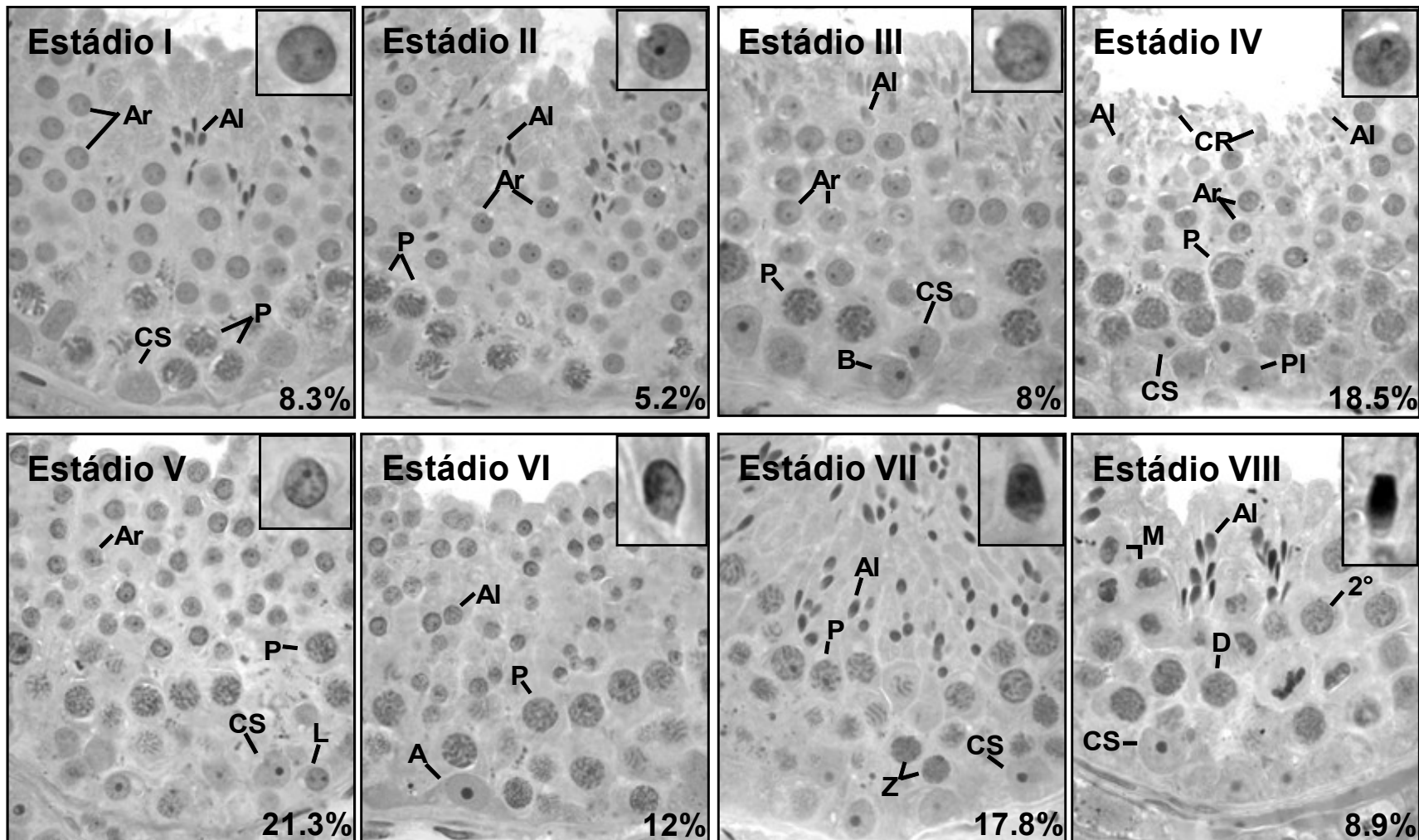
As células germinativas normalmente sofrem apoptose durante a espermatogênese em todos os mamíferos já investigados, principalmente na fase espermatogonial (regulação dependente da densidade) e durante a meiose, provavelmente devido a danos nos cromossomas (Roosen-Runge, 1973; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). As jaguatiricas, semelhantemente aos poucos felídeos estudados neste aspecto (França & Godinho, 2003; Costa et al., 2008), bem como todos os mamíferos já investigados (Roosen-Runge, 1973; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007), perdem cerca de 30% das células germinativas durante a meiose. Entretanto, diferentemente do gato doméstico (França & Godinho, 2003) e semelhante à onça pintada (Costa et al., 2008), não foi observada ausência de camadas de células germinativas nos túbulos seminíferos das jaguatiricas no presente estudo.

Com exceção dos gatos domésticos e de poucos gatos selvagens de pequeno porte, quase todas as 37 espécies de felídeos são consideradas em perigo ou ameaçadas de extinção (O'Brien & Johnson, 2005). Levando-se em consideração a importância da propagação de animais mantidos em cativeiro para a preservação de espécies em perigo de extinção, a reprodução de gatos selvagens necessita tornar-se um componente efetivo nos esforços para a preservação das espécies (Paz et al., 2006). Atualmente, temos à disposição várias técnicas de reprodução assistida e biotecnologias que potencialmente podem ser utilizadas na preservação de espécies ameaçadas de extinção (Pelican et al., 2006; Swanson, 2006; Pukazhenthil et al., 2006; Baudi et al., 2008), como o transplante de espermatogônia tronco de células frescas, congeladas ou mantidas em cultura (Kim et al., 2006; Jahnukainen et al., 2007; Kubota & Brinster, 2008), enxerto de testículos (Rodríguez-Sosa & Dobrinski, 2009) e enxerto de agregados celulares (Honaramooz et al., 2007). Neste sentido, estão sendo desenvolvidos atualmente em nosso laboratório metodologias que permitem a utilização do gato doméstico como receptor para o transplante de espermatogônia tronco, com o objetivo de preservar o plasma germinal de felídeos selvagens ameaçados de extinção, incluindo-se aí a jaguatirica.

Em resumo, no presente estudo foram obtidos importantes dados básicos e abrangentes relacionados à função testicular em jaguatirica, incluindo-se a caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, a duração total do processo espermatogênico, a eficiência da célula de Sertoli e a eficiência espermatogênica.

Portanto, além de fornecer informações importantes para estudos comparativos entre felídeos e outras espécies de mamíferos, o conhecimento gerado nesta investigação pode ser útil na preservação da jaguatirica (*Leopardus pardalis*), utilizando-se do testículo do gato doméstico para gerar e propagar o genoma da jaguatirica, uma vez que estas duas espécies são filogeneticamente próximas.

Fig. 1 – Estádios do ciclo do epitélio seminífero em jaguatirica (I – VIII) baseado no desenvolvimento do acrossomo nas espermátides: espermatogônia do tipo A (A); espermatogônia do tipo B (B); espermatócito em pré-leptóteno (Pl); espermatócito em leptóteno (L); espermatócito em zigóteno (Z); espermatócito em paquíteno (P); espermatócito em diplóteno (D); figura de meiose (M); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/alongada (Al); célula de Sertoli (CS); corpo residual (CR) e espermatócito secundário (2°). O detalhe em maior aumento, presente na parte direita superior na figura 1 representa o desenvolvimento do acrossoma nas espermátides.



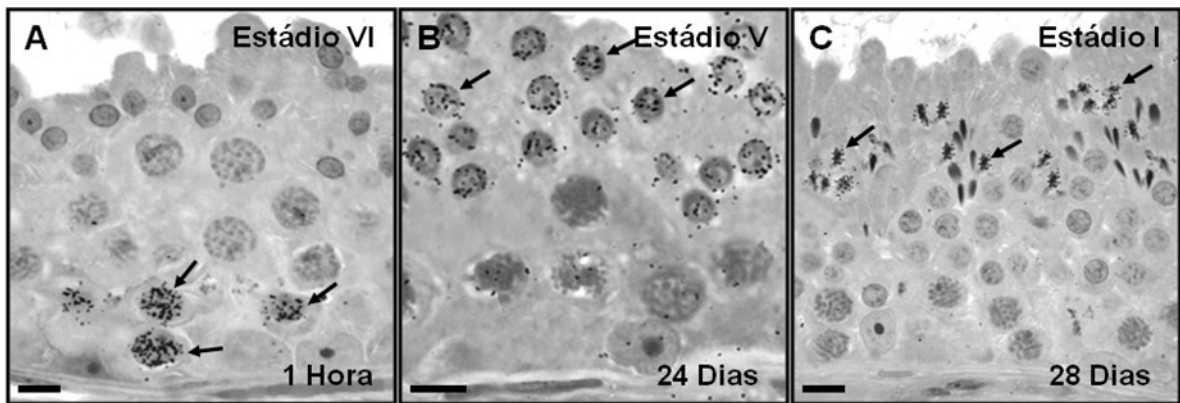


Fig. 2 – Células germinativas mais avançadas marcadas (setas) encontradas nos diferentes períodos de tempo após a marcação pela timidina triciada em jaguatirica: (A) uma hora após a injeção, espermatócito em fase de pré-leptóteno/leptóteno presente no início do estágio VI; (B) 24 dias após a injeção, as células marcadas foram espermátides arredondadas localizadas na porção final do estágio V; (C) 28 dias após a injeção, as células marcadas foram espermátides alongadas presentes na porção média do estágio I.

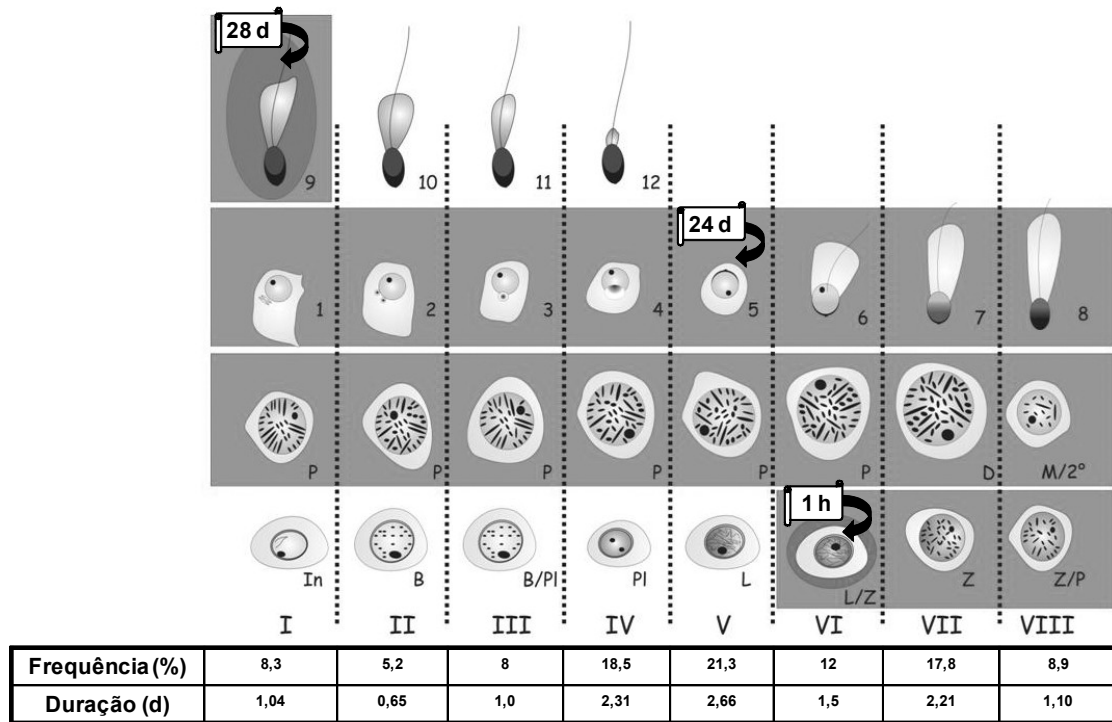


Fig. 3 – Este diagrama ilustra os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero, caracterizados na jaguatirica com base no sistema acrossômico. A coluna vertical (designada em algarismo romano) indica as associações celulares ou estádios presente nesta espécie. A progressão do desenvolvimento das células germinativas é mostrada horizontalmente da esquerda para direita do diagrama. A progressão celular continua na coluna superior da esquerda para direita. O diagrama do ciclo espermatogênico termina com a espermiacção completa. Os seguintes símbolos foram usados para designar os diversos tipos de células germinativas: espermatogônia do tipo intermediária (In); espermatogônia do tipo B (B); espermatócito primário em pré-leptótene (PI); leptótene (L); zigótene (Z); paquíteno (P); diplótene (D); espermatócito secundário (M/2°). Os números arábicos são usados para designar os passos da fase espermiogênica. As frequências (%) e a duração (dias) de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero são também mostradas. Os tipos celulares mais avançados marcados são mostrados nos oito estádios do ciclo, nos três intervalos de tempo utilizados após a injeção de timidina triciada (1 hora, 24 e 28 dias).

Percentual médio de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero, caracterizado de acordo com o sistema acrossômico em jaguatiricas, gato doméstico e jaguatiricas

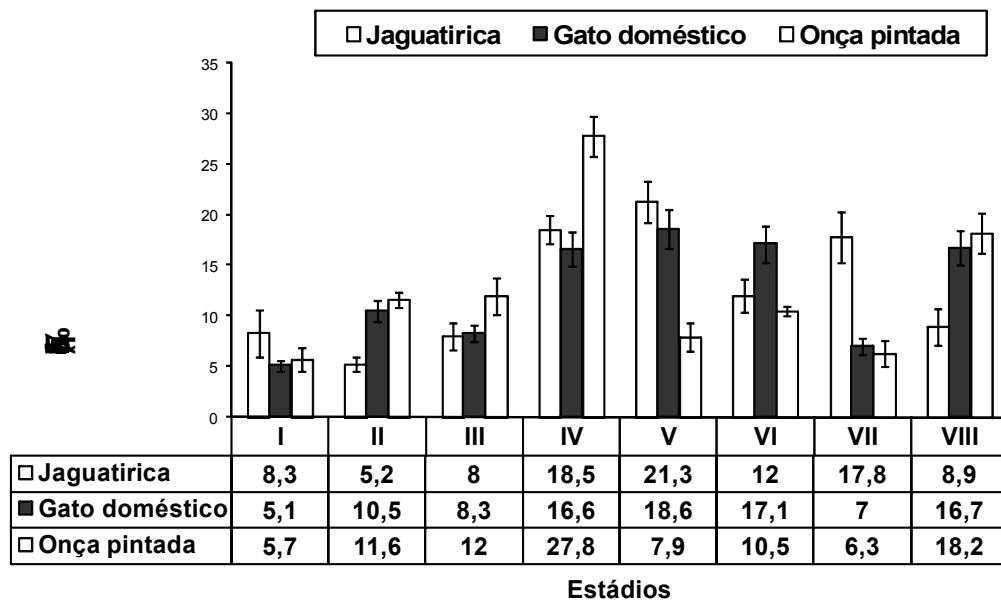


Fig. 4 – Frequências (média ± EPM) dos oito estádios do ciclo baseado no desenvolvimento do acrossoma das espermátides na jaguatirica (no presente estudo; n = 4), gato doméstico (n = 25) e onça pintada (n = 4) (Costa et al., 2008). Note que a frequência dos vários estádios são diferente nestas três espécies de felídeos.

Frequências relativas dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero agrupados em pré-meiótico, meiótico e pós-meiótico em jaguatiricas, gatos domésticos e onças pintadas

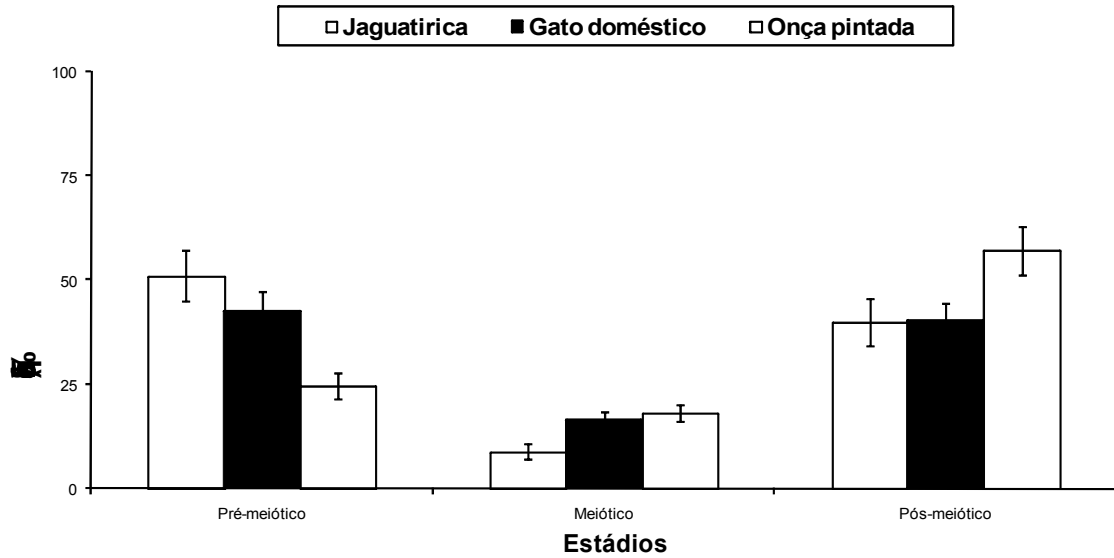


Fig. 5 – Frequências comparativas (média \pm EPM) dos estádios do ciclo agrupados em pré-meiótico (Estádios V–VII), meiótico (Estádio VIII) e pós-meiótico (Estádios I–IV), caracterizados com base no sistema acrossômico em jaguatiricas (no presente estudo; $n = 4$), gato doméstico ($n = 25$) e onça pintada ($n = 4$) (Costa et al., 2008). As frequências foram similares na jaguatirica e gato doméstico, particularmente as frequências do estágio pós-meiótico, quando comparadas com a onça pintada.

Tabela 1 – Dados biométricos e morfométricos em jaguatiricas (média \pm EPM).

Tabela 2 – Duração (dias) do ciclo do epitélio seminífero em jaguatiricas (média ± EPM).

Animal	Tempo após a injeção	Tipo celular marcado mais avançado	Estádio do ciclo	Número de ciclos percorridos	duração do ciclo baseado em leptótenos marcados
1	1 h	PI/L^a	VI	-	-
	27,92 d^d	AI^b	I	2,32	12,04
2	1 h	PI/L^a	VI	-	-
	23,97d^d	Ar^c	V	1,86	12,88
duração média do ciclo baseado no PI/L = 12,5 ± 0,4 d.					

^a PI/L, Espermatócito primário em pré-leptóteno/leptóteno.

^b AI, Espermatíde alongada.

^c Ar, Espermatíde arredondada.

^d Tempo total da injeção de timidina triciada menos 1 h.

Tabela 3 – Contagens celulares, razões celulares e produção espermática em jaguatiricas (média ± EPM).

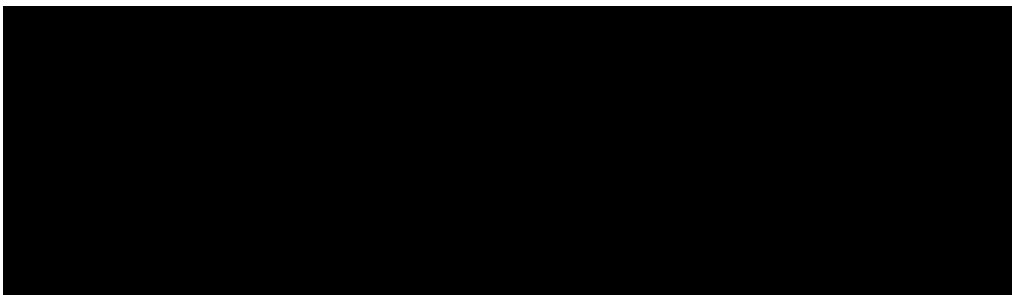


Tabela 4 – Morfometria das células de Leydig em jaguatiricas (média ± EPM).

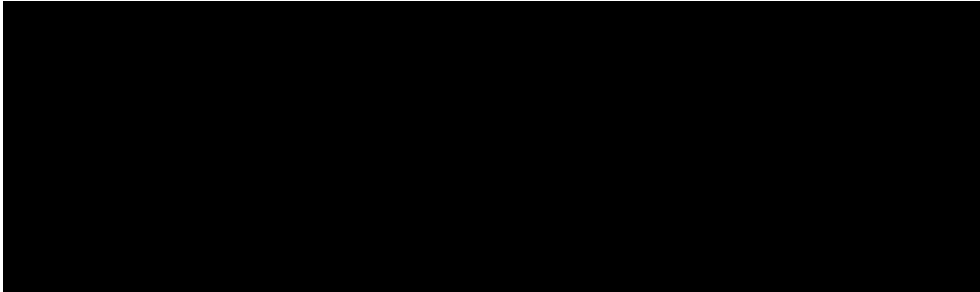
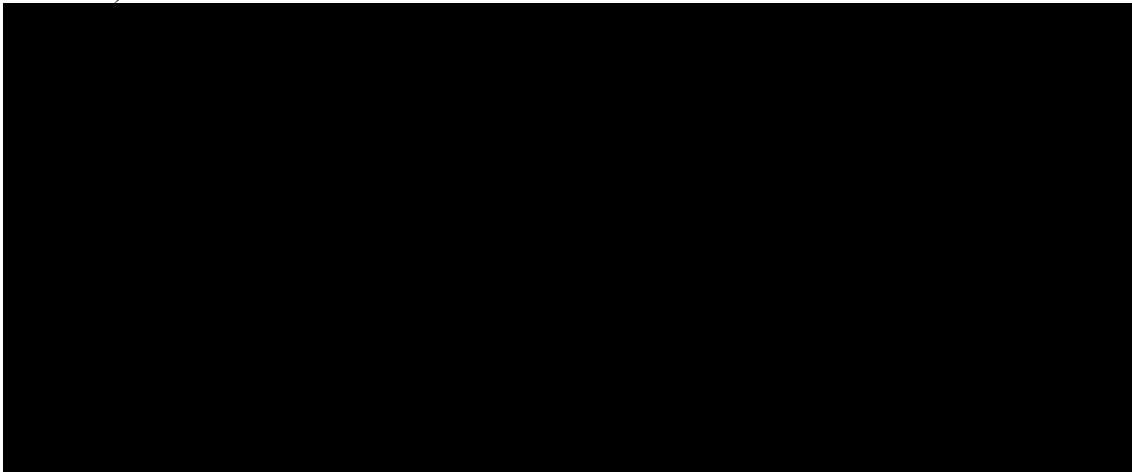
A large black rectangular box redacting the content of Table 4.

Tabela 5 – Parâmetros comparativos relacionados com a estereologia e eventos espermatogênicos em jaguatiricas, gatos domésticos e onças pintadas (sexualmente maduros).

A large black rectangular box redacting the content of Table 5.

Referências bibliográficas

Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec* 1946; 94:238-48.

Almeida FF, Leal MC, França LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod* 2006; 75:792-9.

Amann RP & Almquist JO. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J Dairy Sci* 1962; 45:774-81.

Amann RP & Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci* 1983; 57:380-403.

Baudi DLK, Jewgenow K, Pukazhenthil BS, Spercoski KM, Santos AS, Reghelin ALS, Candido MV, Javorouski ML, Müller G, Morais RN. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology* 2008; 69:204-211.

Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 1977; 44:818-883.

Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science* 2007; 316: 404-5.

Bundy DC. Photographic emulsions and processing. In: Stumpf WE, Solomon HF, editors. *Autoradiography and correlative imaging*. San Diego, CL: Academic Press, 1995, pp. 49-57.

CITES [Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora]. Appendices I, II and III. 2009, p. 6. CITES website oficial (www.cites.org) mantido pela CITES Secretariat.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52:198-236.

Costa GMJ, Chiarini-Garcia H, Morato RG, Alvarenga RLLS, França LR. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology* 2008; 70:1136-1146.

Courot M, Hochereau-de Reviers MT, Ortavant R. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, (eds.), *The Testis*. New York: Academic Press, 1970, pp. 339-432.

Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:137-45.

Dobrinski, I & Travis, AJ. Germ cell transplantation for the propagation of companion animals, non-domestic and endangered species. *2007 Reprod Fertil Dev* 2007;6:732-9.

Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Roca AL, Hupe K, Johnson WE, Geffen E, Harley EH, Delibes M, Pontier D, Kitchener AC, Yamaguchi N, O'Brien SJ, Macdonald DW. The near eastern origin of cat domestication. *Science* 2007; 317:519-523.

Eizirik E, Bonatto SL, Johnson WE, Crawshaw Jr. PG, Vié JC, Brousset DM, O'Brien SJ, Salzano FM. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae). *J Mol Evol* 1998; 47:613-624.

França LR & Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003; 68:1554-1561.

França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 1998; 59:1371-7.

França LR & Russell LD. The testis of domestic animals. In: *Male Reproduction*, Martínez F, Regadera J, editors. A multidisciplinary overview. Madrid, Spain: Churchill Livingstone, 1998, pp. 197-219.

França LR. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination 1992; 4:1716-8.

Hess RA & França LR. Spermatogenesis. Cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY, editor. Molecular mechanisms in spermatogenesis. Landes Bioscience, 2007, pp. 1-15.

Hochereau DE, Reviere MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elephus*. J Reprod Fertil 1978; 54:209-13.

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; 76:43-47.

Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S. [Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts.](#) Hum Reprod 2007; 22(4):1060-7.

Johnson L & Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. Biol Reprod 1981; 24:703-12.

Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, Stephen J. O'Brien SJ. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. Science 2006; 311:73 - 77.

Khaira H, McLean D, Ohl DA, Smith GD. Spermatogonial stem cell isolation, storage, and transplantation. J Androl 2005; 26: 442-50.

Kim Y, Selvaraj V, Dobrinski I, Lee H, McEntee MC, Travis AJ. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. J Androl 2006; 27:248-256.

Kubota H & Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. Methods Cell Biol 2008; 86:59-84.

Leblond CP & Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann N Y Acad Sci 1952; 55:548-584.

Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF: Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente, Fundação Biodiversitas, 2008, pp. 785-786.

Morais RN, Mucciolo RG, Gomes ML, Lacerda O, Moraes W, Moreira N, Graham LH, Swanson WF, Brown JL. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 2002; 57(8):2027-41.

Neves ES, Chiarini-Garcia H, França, LR. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod* 2002; 67:247-255.

O'Brien SJ & Johnson WE. Big cat genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005; 6:407-29.

O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, Pontius J, Pecon-Slattery J, Menotti-Raymond, M. State of cat genomics. *Trends Genet* 2008; 24(6):268-279.

Paz RCR, Eduardo Dias EA, Adania CH, Barnabe VH, Barnabe RC. Ovarian response to repeated administration of alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrinus (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology* 2006; 66:1787-1789.

Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenthii B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* 2006; 66:37-48.

Pukazhenthii B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:77-90.

Rodriguez-Sosa JR & Dobrinski I. [Recent developments in testis tissue xenografting.](#) *Reproduction* 2009; 138:187-194.

Roosen-Runge EC. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 1973; 35:339-48.

Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Vienna, IL: Cache River Press, 1990.

Setchell BP. Possible physiological bases for contraceptive techniques in the male. Hum Reprod 1994; 97:381-7.

Swanson WF. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. Theriogenology 2006; 66: 49-58.

CAPÍTULO 2

O GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O TRANSPLANTE DE ESPERMATOGÔNIAS TRONCO EM FELÍDEOS.

Resumo

O transplante de espermatogônias tronco apresenta enorme potencial em estudos envolvendo biotecnologias aplicadas à reprodução, produção de animais transgênicos e preservação de estoque genético de animais zootécnicos valiosos ou espécies ameaçadas de extinção, podendo também ser utilizado para se investigar o processo espermatogênico e preservar a fertilidade. Além disso, até o presente momento, esta técnica é a única abordagem experimental para se investigar funcionalmente a biologia da espermatogônia tronco. No entanto, apesar de seu alto potencial, estudos utilizando o transplante de espermatogônias tronco com o intuito de se preservar espécies de mamíferos silvestres são ainda bastante incipientes. À semelhança da maioria dos felídeos, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é uma espécie ameaçada de extinção. Nossos principais objetivos neste capítulo da tese foram os de se padronizarem todas as abordagens necessárias para o transplante singênico de espermatogônias tronco entre gatos domésticos (*Felis catus*) e o xenogênico de jaguatirica para o gato doméstico. Também tivemos como objetivos avaliar no presente estudo se as células germinativas transplantadas seriam capazes de colonizarem e se diferenciarem nos testículos dos gatos receptores. Pelo fato de ter apresentado resultados mais consistentes quanto à depleção da espermatogênese, e também em relação à recuperação da mesma nos túbulos seminíferos, em comparação com o tratamento utilizando o busulfan, a irradiação com raios-X foi a técnica de eleição para se deprimir a espermatogênese endógena dos gatos domésticos receptores. Nossos resultados mostraram que os procedimentos de isolamento e enriquecimento das espermatogônias tronco foram bastante eficientes, permitindo que estas células, após serem marcadas com o PKH26, fossem transplantadas com sucesso através da via cirúrgica (*rete testis* extratesticular) por nós padronizada. Nos transplantes singênicos, os diferentes períodos de tempo por nós utilizados (quatro a sete semanas) mostraram que nos túbulos seminíferos analisados, as células germinativas marcadas com PKH26 foram capazes de colonizarem e se diferenciarem até a fase de espermátides alongadas. Em relação ao transplante xenogênico, pelo fato do intervalo de tempo utilizado ter sido mais amplo

(de duas a treze semanas), células germinativas de jaguatirica, desde espermatogônias até espermatozóides, foram encontradas nos túbulos seminíferos e no epidídimo dos gatos domésticos avaliados. Estes resultados bastante positivos para o transplante xenogênico demonstraram que os testículos dos gatos receptores apresentaram ambiente bastante propício para o estabelecimento e o desenvolvimento do processo espermatogênico de jaguatiricas, que divergem filogeneticamente dos gatos domésticos em somente cerca de dois milhões de anos. Pelo fato da família Felidae, que é formada por 37 espécies, descender de um ancestral comum que existiu cerca de 10 – 11 milhões de anos atrás, os resultados inéditos e promissores encontrados no presente estudo sugerem que o gato doméstico apresenta alto potencial para ser utilizado como animal receptor para a preservação do genoma de felídeos selvagens.

Palavras chave: testículo, espermatogênese, busulfan, irradiação por raios-X, transplante de espermatogônias tronco, gato doméstico (*Felis catus*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

1. Introdução

O transplante de espermatogônias tronco apresenta enorme potencial em estudos envolvendo biotecnologias aplicadas à reprodução, produção de animais transgênicos e preservação de estoque genético de animais zootécnicos valiosos ou espécies ameaçadas de extinção (Honaramooz et al., 2003a; Dobrinski, 2005; Khaira et al., 2005; Brinster, 2007; Dobrinski & Travis, 2007; Herrid et al., 2007), além de poder ser utilizado para se preservar a fertilidade (Mikkola et al., 2006). Esta técnica envolve a obtenção de suspensão celular do testículo doador e a injeção desta suspensão nos túbulos seminíferos do testículo receptor, que teve a espermatogênese endógena deprimida (através de drogas quimioterápicas ou irradiação) ou que seja naturalmente desprovido de espermatogônias tronco (ex.: camundongo mutante W/W^v), onde estas células vão se desenvolver e formar espermatozóides viáveis com características genéticas do doador (Oatley & Brinster, 2008). Dentre diversos importantes avanços obtidos com a utilização da técnica de transplante de espermatogônias para o testículo de camundongos encontra-se o transplante xenogênico envolvendo espécies comumente estudadas em condições de laboratório (rato e hamster; Clouthier et al., 1996; Ogawa et al., 1999), espécies domésticas (coelhos, cães, animais domésticos de grande porte tais como bovino, suíno e equino) e primatas (Dobrinski et al., 1999 e 2000; Nagano et al., 2001). Pelo fato de haver colonização das espermatogônias tronco no testículo do receptor sem, no entanto ocorrer a diferenciação destas células além da fase meiótica nos transplantes envolvendo espécies outras que não aquelas de laboratório, em seu conjunto estes estudos demonstraram que o sucesso do transplante provavelmente está relacionado diretamente com o grau de proximidade filogenética das mesmas.

O gato doméstico (*Felis catus*) se apresenta como um valioso modelo em estudos envolvendo a biologia do desenvolvimento, fisiologia e neurociência, constituindo ainda importante modelo para estudos clínicos (O'Brien et al., 2008). Além disso, vários estudos recentes têm demonstrado que o gato doméstico pode ser usado como importante modelo experimental para o desenvolvimento de tecnologias em reprodução assistida, incluindo-se inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência de embrião, bem como criopreservação de espermatozóides e de embrião (Kashiwaki et al., 2005; Pelican et al., 2006; Nagano et al., 2008).

Além das possibilidades acima mencionadas, a partir da utilização do transplante de espermatogônias tronco, o gato doméstico pode potencialmente ser empregado para a preservação do plasma germinal de felídeos que se encontram atualmente ameaçados de

extinção, como por exemplo, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (O'Brien et al., 2005; Pelican et al., 2006; Baudi et al., 2008) cuja função testicular foi recentemente investigada em nosso laboratório (Silva et al., 2009).

Tendo-se em vista os importantes aspectos acima mencionados, os objetivos do presente estudo foram os de se padronizarem as técnicas necessárias para a realização do transplante singênico de espermatogônias troncos entre gatos domésticos e o xenogênico entre jaguatirica e gato doméstico. Neste sentido, os seguintes aspectos foram investigados: 1) depleção da espermatogênese endógena do testículo receptor; 2) isolamento e preparação de suspensão celular enriquecida com espermatogônias tronco de gatos e jaguatiricas; 3) via de transplante da espermatogônias tronco; e 4) avaliação da eficiência do transplante nos testículos dos gatos receptores.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Cinquenta gatos domésticos sem raça definida e idade variando de sete meses a três anos foram utilizados na padronização das técnicas de transplante e no transplante singênico entre gatos domésticos. Para o transplante xenogênico, quatro jaguatiricas com idade entre 2,5 e 3,5 anos e pesando aproximadamente 14 kg foram utilizadas como doadoras. Enquanto sete gatos com idade variando de 8 a 15 meses e cerca de 3,7 kg de peso corporal foram utilizados como receptores. Esses animais foram mantidos no abrigo Brigitte Johnson, localizado na cidade de Belo Horizonte (19°55'15''S; 43°56'16''W), estado de Minas Gerais, Brasil, em condições de iluminação natural, com acesso livre a água e a alimento. Antes dos diversos procedimentos utilizados, todos os gatos receberam uma injeção intramuscular (i.m.) de cloridrato de xilazina (Vetbrands, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, São Paulo, Brasil), associado a ketamina (König, König do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil), na dosagem de 1,1 e 15 mg/kg de peso corporal, respectivamente. As jaguatiricas foram contidas e submetidas à anestesia geral, usando a associação de cloridrato de xilazina (Vetbrands, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, São Paulo, Brasil) e ketamina (König, König do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil), nas doses de 1,1 e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por veterinários, em hospital veterinário local, e seguiu as orientações aprovadas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas

Gerais (CETEA/UFMG; protocolo nº 036/03) e autorizado pelo IBAMA (autorização nº 16714-1).

2.2. Depleção das células germinativas

2.2.1. Tratamento com busulfan

Com o objetivo de se deprimir a espermatogênese endógena, oito gatos domésticos foram utilizados. Quatro deles receberam uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de busulfan (5; 10; 15 e 25 mg/kg), enquanto os quatro restantes receberam duas injeções i.p. de busulfan (5+5; 10+10; 15+15 e 25+ 25mg/kg), com intervalo de 20 dias entre as injeções. Cada gato foi submetido à orquiectomia unilateral e o testículo removido foi usado como controle do status da espermatogênese, antes do tratamento. O testículo remanescente foi removido 40 dias após a primeira injeção de busulfan e tanto o testículo controle quanto o tratado foram preparados para análises histomorfométricas através de microscopia de luz convencional.

2.2.2. Tratamento com irradiação fracionada local

Em outra abordagem, visando também obter receptores viáveis para o transplante de espermatogônias tronco, ou seja, com espermatogênese endógena deprimida, nove gatos foram irradiados usando o equipamento de raios-X Picker-Andrex, operando num potencial constante de 240 kVp e a 4 mA (com medida de HVL de 2,1 mm Cu), no CDTN/CNEN – BH. Este equipamento foi padronizado para se aplicar a dose de 0,29 Gy min⁻¹ e um cone com diâmetro de 3 cm foi utilizado para colimar os raios-X e permitir que somente os testículos fossem irradiados, protegendo assim os tecidos e órgãos adjacentes. Para esse procedimento, os gatos foram posicionados em decúbito dorsal e os membros inferiores foram estendidos caudolateralmente para facilitar o alinhamento do eixo maior dos testículos paralelamente ao eixo maior do corpo. Após este procedimento, os gatos receberam dose fracionada de raios-X (1,5 + 8,0 Gy) com intervalo de 24 horas entre as doses, totalizando assim 9,5 Gy por testículo. Os animais foram orquiectomizados 7, 13 e 17 semanas após a irradiação e rotineiramente preparados para análise histomorfométricas, conforme será descrito em detalhes no próximo item. Como controle do status da espermatogênese neste experimento, utilizamos os mesmos testículos normais obtidos no item anterior.

2.2.3. Avaliação da depleção da espermatogênese endógena

Para se avaliar os efeitos do busulfan e da irradiação, os fragmentos dos testículos foram preparados com técnicas de rotina e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instruments). Os seguintes parâmetros histométricos foram avaliados (Silva et al., 2009) nas secções histológicas obtidas dos animais tratados com busulfan: proporções volumétricas entre os diversos componentes do parênquima testicular; diâmetro tubular; altura do epitélio seminífero, volume individual e número de células de Leydig por testículo. Quanto aos possíveis efeitos do tratamento com busulfan e da irradiação com raios-X especificamente na espermatogênese, 500 secções transversais dos túbulos seminíferos por testículo foram avaliadas. Nesta avaliação, expressadas em percentual, foi observado se os túbulos seminíferos apresentavam-se normais (com espermatogênese completa), com ausência de alguma camada de células germinativas, ou mesmo se não apresentavam células germinativas.

2.3. Preparação e enriquecimento da suspensão celular para serem transplantadas

As células germinativas dos gatos doadores foram obtidas de ambos os testículos de animais púberes e adultos jovens (n=6), enquanto em jaguatiricas (n=4) estas células foram obtidas somente de um testículo através de orquiectomia unilateral. Para o isolamento das células germinativas utilizamos o procedimento de dissociação enzimática, conforme descrito por Honaramooz et al. (2002), com pequenas modificações. Resumidamente, os testículos foram digeridos com 2mg/mL de colagenase (Sigma) dissolvida em DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium – Cultilab), por 30 minutos a 35°C. O parênquima testicular dissociado foi em seguida sedimentado em HBSS (Hank's buffered salt solution free of Ca²⁺/Mg²⁺) e, subsequentemente, digerido com colagenase (2mg/mL, Sigma), hialuronidase (2mg/mL, Sigma) e 50 µg/mL DNase I (Sigma), a 35°C por 30 min. Os túbulos seminíferos digeridos foram lavados em HBSS, decantados e incubados em tripsina 0,25%/1mM EDTA (Sigma) com 50µg/mL DNase I (Sigma) por 15 minutos 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 90µm, centrifugada a 600g por 10 minutos e ressuspensa em DMEM contendo 100 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 IU/mL de penicilina, mais 5% de FBS. O enriquecimento da

suspensão celular contendo espermatogônias tronco foi obtido centrifugando-se a solução celular em Percoll descontínuo (Cultilab), seguido pelo plaqueamento diferencial (Rodríguez-Sosa et al., 2006; Luo et al., 2006). No plaqueamento diferencial, as células (1×10^8 células) foram cultivadas em DMEM/F-12 (Nutrient Mixture F-12, Gibco Life Technologies) contendo 5% de FBS, 10000U/L penicilina, 10mg/L de estreptomicina e 10mM Na_2HCO_3 . Estas placas de cultura com 60.1 cm^2 foram mantidas por 12 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO_2 . 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, estas placas foram tratadas com 2 mL de tripsina diluída (1:20) em DPBS, à temperatura ambiente, numa incubadora e agitador refrigerado. 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 o transplante, conforme será descrito adiante. O percentual de células viáveis foi determinado pelo azul de tripan.

2.4. Marcação das células selecionadas

Com a finalidade de se acompanhar o desenvolvimento das células germinativas no testículo do animal receptor, antes do transplante nos túbulos seminíferos estas células foram marcadas com o PKH26 (Sigma). A marcação com o PKH26 foi realizada de acordo com as instruções do fornecedor. Resumidamente, as células foram lavadas em DMEM, centrifugadas a 400g por 10 minutos e o “pellet” obtido foi ressuspensionado em diluente C (fornecido com o kit). Imediatamente antes da marcação, 20 a 30 $\times 10^{-6}$ molar do corante PKH26 foi preparado usando o diluente C, e a solução assim obtida foi misturada cuidadosamente com as células, sendo incubado a seguir por 2 a 6 min. O processo de marcação foi interrompido pela adição de FBS e em seguida as células foram lavadas três vezes em DMEM. Após a última lavagem, as células foram ressuspensionadas numa concentração final de 4×10^7 células/mL.

2.5. Padronização da via de transplante

À semelhança dos animais domésticos de grande porte (Honaramooz et al., 2003a; Mikkola et al., 2006; Herrid et al., 2007), em gatos a rede extratesticular

conecta-se com os ductos eferentes na base da cabeça do epidídimo (Fig. 1A-B). Merece ser aqui mencionado que antes do transplante *in vivo*, testículos frescos dissecados (n=22) foram utilizados para se padronizar a via de transplante de espermatogônias tronco no interior dos túbulos seminíferos (injeções *ex vivos*). Assim, com a o auxílio de microscópio estereoscópico, a cabeça do epidídimo foi cuidadosamente separada da túnica albugínea, sendo em seguida afastada para a exposição da rede extratesticular (Fig. 1B). Posteriormente, uma agulha fina (29 ga) conectada a um micro injetor (Narishige IM -9B) foi introduzida dentro da rede extratesticular (Fig. 1C), sendo em seguida injetada cuidadosamente tinta nanquim, que serviu como marcador da eficiência da via de injeção. Logo após esta injeção, o testículo foi coletado e fixado em fixador de Bouin e preparado rotineiramente para investigações histológicas (Fig. 1D-F).

Em continuidade à padronização da via de transplante, outro grupo de animais (n=12) foi submetido a abordagem cirúrgica (*in vivo*), utilizando-se procedimento semelhante ao descrito por Rodriguez-Sosa et al. (2009). Resumidamente, incisão de aproximadamente 2 cm foi feita ao longo da superfície ventro-lateral do escroto e o testículo foi exposto junto com a túnica vaginal. Posteriormente, outra incisão na porção média da túnica albugínea, que se estendeu da cauda do epidídimo ao cone vascular, foi efetuada. Assim, semelhantemente ao descrito para a injeção *ex vivo*, o testículo foi exposto e a injeção de corante também foi efetuada. Posteriormente, os gatos foram orquiectomizados e os testículos fixados em Bouin.

2.6. Transplante das células germinativas

O transplante singênico das células germinativas nos gatos receptores foi efetuado conforme foi descrito acima para o procedimento *in vivo*, 50 dias após o animal receptor ter tido sua espermatogênese endógena deprimida. Cada testículo receptor (gato-gato, n=8; gato-jaguar, n=9) foi cuidadosamente microinjetado com 200 µL de solução celular contendo 5×10^6 células germinativas (Fig. 7A) e, logo após a injeção, os testículos foram reintroduzidos na túnica albugínea, que foi suturada sem a aposição completa das extremidades (Fig. 7B). O testículo, juntamente com a albugínea, foi reintroduzido no escroto, que posteriormente foi suturado. Após essa abordagem, os animais receberam 2,2 mg/kg de peso corporal, Cetoprofeno (Ketojet, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil), e 2,5 mg/kg Enrofloxacino (Flotril, Indústria Química Farmacêutica, Schering-Plough S/A, Rio de

Janeiro, RJ, Brasil) por três dias consecutivos, com a finalidade de se evitar eventuais infecções decorrentes do procedimento do transplante. O transplante xenogênico de espermatogônias tronco das jaguatiricas para gatos domésticos foi semelhante ao já descrito para o transplante singênico.

2.7. Avaliação dos testículos transplantados

Os testículos receptores do transplante singênico foram avaliados com 3, 5 e 7 semanas após o transplante, enquanto aqueles do transplante xenogênico foram coletados entre 2 a 13 semanas pós-transplante. Pelo fato da duração total do processo espermatogênico no gato e na jaguatirica ser de aproximadamente 7 e 8 semanas, respectivamente (França & Godinho, 2003; Silva et al., 2009), em tese estes intervalos permitiriam que células germinativas pelo menos até a fase espermiogênica pudessem ser eventualmente observadas. Vale ressaltar que, no transplante xenogênico, em cinco dos sete gatos domésticos receptores utilizados somente um testículo foi transplantado. Nestes animais, o testículo contralateral foi utilizado como controle e orquiectomizado juntamente com aquele transplantado.

Para a avaliação da eficiência do transplante, cada testículo foi seccionado em quatro fragmentos. Um destes fragmentos foi digerido com colagenase e hialuronidase, conforme já descrito, e os túbulos seminíferos isolados foram examinados (avaliação *in toto*) para se verificar a extensão da colonização. Dois outros fragmentos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido e foram seccionados em criostato (~5µm) para se investigar a eventual presença de células marcadas pelo PKH26, através de microscopia de fluorescência. Com o intuito de se avaliar a eventual presença de células germinativas através de microscopia de luz, o quarto fragmento foi fixado por imersão, em solução de glutaraldeído 4%.

2.8. Avaliação morfológica e morfométrica dos espermatozoides

Esta avaliação foi feita através de microscopia de interferência de contraste diferencial (DIC) e microscopia de luz convencional. Para tal finalidade, espermatozoides foram coletados dos epidídimos nos dois gatos (região da cabeça, corpo e cauda), e nas duas jaguatiricas adultas os espermatozoides foram obtidos através da técnica de eletroejaculação. Para cada animal, nos seus eixos transversais (largura) e longitudinais (altura) maiores, vinte espermatozoides tiveram suas cabeças mensuradas, utilizando-se o programa Olympus Soft Imaging Solution GmbH. Este mesmo

programa foi também empregado para se avaliar o comprimento da cauda (flagelo) de vinte espermatozoides para cada um dos quatro felinos utilizados.

2.9. Análise estatística

Todos os dados obtidos são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e quando pertinente foram analisados através de teste "t". Esta análise foi feita utilizando-se o programa STATISTICA 3.1 software para Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, E.U.A.).

3. Resultados

3.1. Efeitos do busulfan nos testículos

A Tabela 1 mostra os dados biométricos e morfométricos do testículo dos seis gatos sexualmente maduros utilizados nesta fase do estudo. Conforme pode ser observado nesta tabela, variação muito pequena foi notada para o peso corporal dos gatos avaliados no início e final do tratamento com busulfan. Quanto ao peso testicular, em relação ao seu respectivo controle, redução expressiva (~40%) foi observada somente no gato tratado que recebeu duas injeções de busulfan na dosagem de 15+15mg/kg. No entanto, em média, incluindo-se todas as dosagens utilizadas, esta redução foi de pouco mais de 5% e a mesma tendência foi encontrada para o índice gonadossomático. Em relação ao diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero, em todos os gatos tratados houve reduções nestes parâmetros e as mesmas foram mais pronunciadas nos gatos tratados com as maiores doses. Desta forma, em média, o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero diminuíram cerca de 14%. Em decorrência destas alterações, o percentual ocupado pelos túbulos seminíferos diminuiu quase 11%, enquanto aumento da mesma magnitude foi observado para o compartimento intertubular. Compartimento este, no qual as células de Leydig apresentaram notável aumento (~75%) em seu percentual nos gatos tratados. Este aumento relativo foi resultante da diminuição do compartimento tubular e de hipertrofia (~70%) das células de Leydig nos gatos tratados, nos quais o número médio por testículo desta importante célula esteroideogênica foi praticamente o mesmo em comparação com os gatos controles. Quanto ao percentual de túbulos seminíferos afetados pelo tratamento, ou seja, desprovidos em graus variados de células germinativas, houve um pronunciado efeito dose-dependente (Tabela 1 e Figs. 2-4). Por

exemplo, nos animais que receberam uma dose de 5 mg/kg de busulfan e naqueles tratados com 15+15 mg/kg o percentual de túbulos seminíferos afetados foi de 0,6 e 81,7%, respectivamente. Com o intuito de se obter depleção mais eficiente da espermatogênese, também injetamos doses maiores de busulfan (25 mg e 25+25 mg) em dois gatos adultos. No entanto, provavelmente estas doses foram muito elevadas causando a morte destes animais, o que nos levou a buscar alternativas menos drásticas para se deprimir a espermatogênese endógena em gatos domésticos que são animais considerados muito sensíveis a determinados tipos de tratamentos, além de permanecerem muito estressados quando mantidos em ambientes inóspitos tais como gaiolas.

3.2. Efeitos da irradiação nos testículos

Os resultados referentes à biometria, morfometria e histologia dos testículos dos gatos irradiados encontram-se na Tabela 2 e Figura 5. Em relação aos gatos controles utilizados nos estudos desenvolvidos por França & Godinho (2003), redução marcante e na faixa de 40 a 60% foi observada para o peso dos testículos dos animais irradiados. Apesar de haver evidente tendência de menor peso testicular nos intervalos de tempo maior após a irradiação, o índice gonadossomático (peso conjunto dos testículos dividido pelo peso corporal) dos três grupos de gatos irradiados foi de 0,03% e aproximadamente 60% menor do que o observado para os gatos do grupo controle. Quanto aos efeitos da irradiação nas células germinativas, sete semanas pós-irradiação o epitélio seminífero apresentava-se quase totalmente desprovido de células da linhagem espermatogênica. Desta forma, menos de 5% dos túbulos seminíferos continham células germinativas, essencialmente espermatogônias, enquanto cerca de 97% dos túbulos seminíferos mostravam somente células de Sertoli. Com treze semanas após a irradiação, considerável recuperação da espermatogênese endógena foi observada e quase 25% dos túbulos seminíferos apresentavam células germinativas de todas as três fases do processo espermatogênico (espermatogonial, meiótica e espermiogênica), particularmente espermatócitos primários e espermatogônias. Já dezessete semanas pós-irradiação, esta recuperação estava bem mais evidente e quase 10% dos túbulos mostravam espermátides arredondadas/alongadas. Consequentemente, menor quantidade de túbulos apresentando somente células de Sertoli (~63%) eram encontrados (Tabela 2 e Figura 5).

3.3. Dissociação enzimática do parênquima testicular, enriquecimento e marcação das espermatogônias e via de injeção do transplante

O protocolo escolhido para a dissociação das células germinativas foi o utilizado em animais doméstico de grande porte, que à exemplo do gato doméstico e da jaguatirica apresentam quantidade considerável de tecido conjunto no parênquima testicular (Honaramooz et al, 2002 e 2003b ; Izadyar et al, 2003). Após o isolamento, as células germinativas apresentaram viabilidade de aproximadamente 95%, viabilidade esta, verificada pelo método de exclusão com o azul de tripan (dado não mostrado) que penetra somente nas células que estão mortas. O enriquecimento da solução celular contendo espermatogônias, dentre elas espermatogônias tronco, foi realizado através da utilização do gradiente descontínuo de Percoll, seguido do plaqueamento diferencial e foi observado em microscópio de contraste de fase. De acordo com a análise morfológica das células (dado não mostrado), os resultados encontrados foram bastante positivos. O protocolo por nós utilizado para a marcação das espermatogônias com o PKH26 também forneceu ótimos resultados, sendo assim bastante bem sucedido.

Conforme padronizado em abordagens *ex vivo*, em 80% dos testículos a injeção de tinta nanquim, visualizada através do preenchimento de túbulos seminíferos via rede extratesticular, foi bem sucedida (Fig. 1E). Nestes testículos, aproximadamente 65% dos túbulos seminíferos encontravam-se preenchidos com o corante (Fig. 1F). O procedimento de padronização *in vivo* apresentou resultados semelhantes ao *ex vivo*. Desta forma, nos sentimos bastantes confortáveis com a utilização desta metodologia *in vivo*, que foi assim empregada no transplante de espermatogônias cujos resultados encontram-se logo a seguir.

3.4. Avaliação dos testículos no transplante singênico

Conforme pode ser visualizado na Figura 6, células germinativas isoladas ou formando grupos e marcadas com PKH26 foram observadas no túbulo seminífero de gatos receptores com 4–5 semanas após o transplante (Fig. 6A; 6B). Nos túbulos seminíferos que foram parcialmente digeridos e analisados *in toto* em menor aumento, sete semanas após o transplante, foi possível evidenciar áreas com grande número de células germinativas marcadas com o PKH26 (Fig. 6C). Mostrando a progressão das células germinativas nos túbulos seminíferos dos gatos receptores, neste mesmo período de tempo, espermátides arredondadas e alongadas marcadas com o PKH26 foram observadas (Fig. 6D).

Vale a pena ser ressaltado que tanto macro quanto microscopicamente, os testículos dos gatos receptores não apresentaram sinais evidentes de infecções ou outras patologias nos diversos intervalos de tempo avaliados após o transplante. Entretanto, adesão ligeira entre a túnica vaginal visceral e a túnica vaginal parietal foi eventualmente observada.

3.5. Avaliação dos testículos no transplante xenogênico

Conforme já foi mencionado no item de material e métodos, do total de sete gatos receptores dois tiveram ambos os testículos transplantados com células germinativas de jaguatirica, enquanto em cinco deles somente um testículo foi transplantado. Os resultados encontrados mostraram que apesar do peso médio dos testículos transplantados terem sido ligeiramente maior (7%) do que os daqueles que não receberam células germinativas, a diferença encontrada não foi significativa ($p>0,05$).

A figura 7 ilustra as diversas etapas realizadas durante o transplante xenogênico. À semelhança do transplante singênico, os testículos dos gatos receptores apresentaram-se aparentemente normais (Figura 7C).

Tanto nas análises dos túbulos seminíferos *in toto*, quanto nas avaliações histológicas destes túbulos em microscopia de fluorescência, pudemos observar que, embora em quantidade apenas razoável, células germinativas do doador, marcadas com PKH26, estavam presentes em todos os testículos, nos diferentes períodos de tempo utilizados neste estudo (Figura 8). Portanto, as células germinativas de jaguatiricas foram capazes de colonizar o epitélio seminífero de gatos domésticos (Figura 8B) e se diferenciarem em estágios mais avançados formando espermatídes alongadas com onze semanas pós-transplante (Fig. 8F), e mesmo espermatozóides que estavam presentes no ducto epididimário cerca de treze semanas após o transplante (Figura 8H).

3.6. Morfometria dos espermatozóides

Esta avaliação (Figura 9) mostrou que não houve diferença marcante ($p>0,05$) no tamanho (morfologia) da cabeça dos espermatozóides coletados nos epidídimos de gatos e de jaguatiricas. No entanto, pode ser mencionado que a cabeça do espermatozóide da jaguatirica foi ligeiramente (~9%) mais larga ($2,7\pm 0,04 \mu\text{m}$ vs. $2,5\pm 0,04 \mu\text{m}$) do que a do gato doméstico, que se apresentou discretamente (~8%) mais alongada ($\sim 5,7\pm 0,07 \mu\text{m}$ vs. $5,2\pm 0,06 \mu\text{m}$). Quanto ao comprimento do flagelo, em

comparação com o gato doméstico o mesmo foi cerca de 20% maior ($p < 0,05$) na jaguatirica ($\sim 50 \pm 0,2 \mu\text{m}$ vs. $59 \pm 0,4 \mu\text{m}$).

4. Discussão

Conforme comentado com muita propriedade e esperado por Dym (1994), que é um dos mais tradicionais e conceituado pesquisador na área de espermatogônias em mamíferos, inúmeros avanços já foram realizados através da utilização da técnica de transplante de espermatogônias (Brinster, 2007; Oatley & Brinster, 2008; Schlatt et al., 2009). Técnica esta desenvolvida em meados da década passada por Brinster e colaboradores (Brinster & Zimmermann, 1994; Brinster & Avarbock, 1994) e que até o presente momento é a única abordagem experimental para se investigar funcionalmente a biologia da espermatogônia tronco. No entanto, apesar de seu alto potencial, estudos utilizando o transplante de espermatogônias tronco com o intuito de se preservar espécies de mamíferos silvestres são ainda bastante incipientes (Kim et al. 2006). Desta forma, conforme será discutido a seguir, no nosso conhecimento o presente estudo é a primeira investigação a obter sucesso com a utilização do transplante xenogênico de espermatogônias para a preservação do plasma germinal de uma espécie de mamífero ameaçada ou em risco de extinção, que no nosso caso específico é a jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Para realizar o transplante de espermatogônias tronco é necessário inicialmente promover a depleção da espermatogênese endógena, ou utilizar animais que naturalmente não apresentem espermatogênese (Ogawa et al., 1997; França & Russell, 2000). Diversas abordagens podem ser utilizadas para se deprimir a espermatogênese endógena, tais como o tratamento com baixas ou altas temperaturas, criptorquidismo experimental, irradiação e o uso de drogas quimioterápicas, dentre outras. No entanto, o tratamento com o quimioterápico busulfan tem sido a metodologia mais empregada para promover a depleção de células germinativas em diversas espécies de vertebrados, tanto na fase fetal quanto em animais adultos (Avarbock et al., 1996; França & Russell, 2000; Brinster, 2003; Honaramooz et al. 2005; Lacerda et al., 2006; Mikkola et al. 2006; Kanatsu-Shinohara et al., 2008; Lacerda et al., 2008). Mais recentemente, a irradiação local fracionada dos testículos (com raios-X ou raios gama) também tem sido considerada como alternativa viável para se promover a depleção da espermatogênese endógena em mamíferos (Izadyar et al. 2003; Honaramooz et al. 2005; Oatley et al. 2005; Kim et al., 2006 e 2008).

Por ser mais acessível logisticamente e não demandar aparelhos especiais e cuidados extremos, no presente estudo, o tratamento com busulfan foi aquele utilizado inicialmente para se deprimir a espermatogênese endógena nos gatos domésticos adultos investigados. Nossos resultados mostraram que este tratamento foi capaz de afetar os túbulos seminíferos de forma dose-dependente e, embora não tenha promovido depleção que possa ser considerada excelente, foi mais efetivo quando os animais receberam duas doses desta droga quimioterápica em concentrações mais elevadas. No entanto, a tentativa de se deprimir mais drasticamente a espermatogênese endógena resultou-se infrutífera pelo fato de dosagens mais elevadas do que 15 mg/kg de peso corporal terem sido letais para os gatos tratados, sugerindo em tese que a dosagem supostamente ideal estaria muito próximo da dose letal. Além disso, como o busulfan é uma droga que promove também imunodepressão (Ogawa et al., 1999), os gatos tratados devem ser muito bem cuidados nos períodos pré e pós-injeção.

A literatura mostra que as dosagens utilizadas para se deprimir de maneira eficiente a espermatogênese é muito variada nas diferentes espécies, por exemplo, em camundongos a mesma é de 40 mg/kg (Bucci & Meistrich, 1987), enquanto em tilápias nilóticas duas doses (18 + 15 mg/kg) são necessárias (Lacerda et al., 2006). Por outro lado, dosagens maiores do que 10 mg/kg causam mortalidade em coiotes (Stellflug et al., 1985), reforçando assim a sensibilidade espécie-específica a esta droga. Merece ser ressaltado que mesmo não tendo promovido depleção bastante eficaz da espermatogênese nos gatos domésticos por nós investigados, esta depleção possibilitaria a colonização do epitélio seminífero destes animais pelas espermatogônias transplantadas, pelo fato de provavelmente existirem quantidades consideráveis de nichos espermatogoniais disponíveis. Quanto ao grande aumento no tamanho das células de Leydig, sem que tenha ocorrido acréscimo no número destas células no testículo remanescente dos gatos tratados, este aumento seria esperada em decorrência desta importante célula somática esteroideogênica ter sido provavelmente mais estimulada por fatores regulatórios tais como, por exemplo, o LH, resultando assim em hipertrofia compensatória no tamanho destas células no testículo remanescente, após a realização de orquiectomia unilateral (Furuya, 1990).

À semelhança do busulfan, a literatura mostra que os efeitos da irradiação são também espécie e dose-dependentes. Assim, em bezerros, 12 semanas após a irradiação uma única dose de 10 a 14 Gy aboliu a espermatogênese em 55% dos túbulos seminíferos (Izadyar et al., 2003). Enquanto em camundongos doses de 1,5 + 12 Gy,

com intervalo de 24 horas entre as mesmas, promoveu a depleção em 90–97% dos túbulos seminíferos que foram avaliados 21 semanas após a irradiação (de Ruiters-Bootsma et al., 1977; Creemers et al., 2002). Já em gatos e cães, tratamento com irradiação fracionada por três dias consecutivos (doses diárias de 3 Gy) causou a depleção em ~95% e ~90% dos túbulos seminíferos, nos animais avaliados com 8 e 32 semanas após o tratamento, respectivamente (Kim et al., 2006 e 2008). Alertando para uma possível alteração dos elementos somáticos do testículo (ex: células de Sertoli, de Leydig e peritubulares mióides), causando assim danos irreversíveis espermatogênese, em ratos uma única dose de 6 Gy resultou no bloqueio da diferenciação das espermatogônias (Meistrich et al., 2000; Zhang et al., 2007). Desta forma, nas condições de irradiação acima mencionadas para esta espécie, a utilização da mesma como receptor para o transplante de células germinativas torna-se inviável. Neste aspecto, portanto, a irradiação poderia ser considerada menos apropriada do que o busulfan, para o qual até o presente momento não foram descritos efeitos deletérios nas células somáticas do testículo.

No presente estudo, a depleção da espermatogênese endógena em gatos domésticos que tiveram seus testículos irradiados apresentou resultados bastante positivos, conforme pode ser verificado através de acentuadas reduções do peso deste órgão e do IGS, nos animais avaliados sete semanas após o tratamento. Portanto, pelo fato de quase 100% dos túbulos seminíferos estarem desprovidos de células germinativas, a disponibilidade de nichos para serem colonizados pelas espermatogônias transplantadas seria bastante adequada. Por outro lado, a substancial repopulação (~40%) observada nos túbulos seminíferos dos gatos avaliados 17 semanas após o tratamento mostrou que os elementos somáticos do testículo apresentavam-se funcionalmente normais. Ainda, os resultados por nós obtidos referentes a recuperação da espermatogênese endógena foram melhores do que aqueles encontrados em estudos anteriores desenvolvidos com gatos domésticos (Kim et al., 2006), bem como em outros mamíferos (Meistrich et al., 2000; Izadyar et al., 2003; Kim et al., 2008). Reforçando assim a escolha da irradiação como método de eleição para se deprimir a espermatogênese endógena dos gatos domésticos, que foram utilizados como receptores nos experimentos de transplante singênico e xenogênico desenvolvidos no presente estudo.

O processo de isolamento, bem como os resultados obtidos pela digestão enzimática dos testículos de gatos domésticos e das jaguatiricas investigadas no

presente estudo, foram semelhantes aos descritos em estudos anteriores para animais domésticos (Honaramooz et al., 2002, 2003a e 2003b; Izadyar et al., 2003; Kim et al., 2006; Rodriguez-Sosa et al., 2006; Herrid et al., 2007; Kim et al., 2008; Rodriguez-Sosa et al., 2009). Da mesma forma, os procedimentos utilizados para o enriquecimento das espermatogônias de gatos domésticos e jaguatiricas, utilizando-se gradiente de Percoll descontínuo, seguido de plaqueamento diferencial, mostraram resultados semelhantes aos estudos já desenvolvidos neste aspecto (Rodriguez-Sosa et al., 2006; Luo et al., 2006). Embora não tenhamos utilizado marcadores moleculares para se quantificar o grau de enriquecimento das espermatogônias tronco das duas espécies de felídeos por nós investigadas, as espermatogônias consideradas mais indiferenciadas (dentre elas a espermatogônia tronco) foram identificadas através de critérios morfológicos. Pois, conforme já descrito para bovinos (Izadyar et al., 2003; Aponte et al., 2005), estas células germinativas podem ser facilmente identificadas pela forma arredondada e volumosa de seu núcleo, que também apresenta nucléolo bastante evidente. Merece ser ressaltado que mesmo para as espécies bastante investigadas neste aspecto, tais como camundongos e ratos, para as quais já existem alguns marcadores de espermatogônias tronco ou de subpopulações de espermatogônias indiferenciadas, estes eventuais marcadores não garantem que todas as espermatogônias tronco estariam contidas nas populações celulares avaliadas e/ou selecionadas (Aponte et al., 2005; Oatley & Brinster, 2008; Lucas et al., 2009). Por outro lado, estudos mais recentes sugerem que as espermatogônias tronco que estariam comprometidas com a diferenciação (ex: espermatogônias pareadas e alinhadas), e mesmo aquelas consideradas já diferenciadas (espermatogônias A1-4), poderiam potencialmente gerar espermatogônias tronco funcionais com capacidade de repopular testículos desprovidos de espermatogênese em decorrência de injúrias (Nakagawa et al., 2007; Barroca et al., 2009). Portanto, neste contexto acima mencionado, seria razoável considerar que a população de células espermatogoniais por nós isolada e transplantada provavelmente continha número apreciável de células tronco. Além disso, no nosso conhecimento, não existem ainda marcadores específicos para espermatogônias tronco de gatos. Em outro contexto, com o objetivo de se acompanhar com precisão o desenvolvimento das células transplantadas nos animais receptores, o PKH26, que é um eficiente marcador de membrana plasmática (Honaramooz et al., 2002 e 2003b; Herrid et al., 2007; Lacerda et al., 2006), foi utilizado com sucesso, conforme será visto adiante.

Em relação à via de transplante, diferentemente dos pequenos mamíferos (ratos, camundongos e hamsteres), nos animais domésticos de grande porte as espermatogônias são usualmente transplantadas dentro da rede intratesticular, localizada no mediastino testicular, com o auxílio de sonda guiada por ultrassonografia (Honaramooz et al., 2002 e 2003a; Izadyar et al., 2003). Entretanto, em animais domésticos que apresentam testículo relativamente pequeno, como por exemplo, o gato doméstico, normalmente é difícil visualizar a região do mediastino, bem como a rede intra e extratesticular (Rodriguez-Sosa et al., 2006). Desta forma, à semelhança de estudos desenvolvidos com carneiros (Rodriguez-Sosa et al., 2009), a abordagem cirúrgica foi por nós utilizada para se transplantar as espermatogônias tronco do animal doador na rede extratesticular dos gatos domésticos receptores. No entanto, para se efetivar o transplante e todas as abordagens cirúrgicas inerentes, empregamos o microscópio estereoscópico que possibilitou maior precisão dos procedimentos requeridos. Ao que parece, esta cuidadosa abordagem diminuiu bastante os riscos de alterações na função testicular, pelo fato da região da rede extratesticular ser bastante vascularizada (Ogawa et al., 1997). O que não ocorreu nos estudos desenvolvidos com carneiros (Rodriguez-Sosa et al., 2009), nos quais atraso no desenvolvimento da espermatogênese foi observado, bem como lesões nos testículos, sendo estas alterações atribuídas ao procedimento cirúrgico que provavelmente causou lesões locais do sistema circulatório testicular e mesmo nos mecanismos de termorregulação deste órgão (Rodriguez-Sosa et al., 2009).

O sucesso do transplante singênico entre gatos domésticos foi confirmado pela presença de células da linhagem germinativa marcadas com PKH26, em múltiplas áreas dos túbulos seminíferos, em todos os oito testículos receptores avaliados. Assim, quatro e cinco semanas pós-transplante, a presença de células germinativas marcadas com PKH26, isoladas ou em pequenos grupos, foram observadas no epitélio seminífero, indicando que as espermatogônias do animal doador colonizaram efetivamente os túbulos seminíferos, logo após o transplante. É importante ser salientado que em camundongos já foi demonstrado que, após o transplante, o processo de colonização, com a formação de novas espermatogônias tronco, dura pouco menos de duas semanas, antes destas células se comprometerem com a diferenciação rumo à formação de espermatozóides (Parreira et al., 1998; Ohta et al., 2000). Neste sentido, pode ser considerado que em gatos domésticos, ou mesmo em outras espécies de mamíferos, período de tempo semelhante deve ocorrer após o transplante para que as espermatogônias colonizem os túbulos, e se diferenciem para dar continuidade ao

processo espermatogênico. Já com sete semanas após o transplante, áreas consideráveis dos túbulos seminíferos, contendo células germinativas marcadas com PKH26, foram encontradas em testículos que foram digeridos parcialmente com enzimas apropriadas (avaliação *in toto*). Provavelmente, estas áreas devem ser resultantes da autorrenovação e da diferenciação de uma ou mais espermatogônias tronco transplantadas (Nagano et al., 1999). Ainda no intervalo de sete semanas, espermátides arredondadas e alongadas foram identificadas em cortes obtidos no criostato, indicando assim que o processo de diferenciação final destas células estava em curso nos túbulos seminíferos do animal receptor. Desta forma, podemos considerar que as padronizações por nós efetuadas em todas as fases requeridas, desde a preparação do receptor até o transplante das células germinativas, foram revestidas de sucesso, propiciando assim a execução do transplante xenogênico, objetivo principal do presente estudo.

Com o objetivo de melhor acompanhar a evolução da espermatogênese, e mesmo a eventual presença de espermatozóides nos epidídimos dos gatos domésticos transplantados com espermatogônias de jaguatirica, o intervalo de tempo utilizado na avaliação do transplante xenogênico foi de duas a treze semanas. A escolha deste intervalo de tempo partiu do conhecimento prévio de que a duração total do processo espermatogênico na jaguatirica é de cerca de oito semanas (Silva et al., 2009) e também da informação de que o genótipo da célula germinativa determina a duração deste processo (França et al., 1998). Nos testículos analisados duas semanas pós-transplante, verificamos a presença de células marcadas com PKH26 nos túbulos seminíferos analisados *in toto*. Estes resultados foram confirmados em cortes de congelação, mostrando que, pelo seu tamanho e localização, estas células marcadas nos túbulos seminíferos provavelmente eram espermatogônias. Já os testículos analisados com quatro semanas, tanto *in toto* quanto em cortes obtidos no criostato, mostraram a presença de grupos de células germinativas marcadas com o PKH26, sugerindo que, após um determinado período de colonização e expansão, estas células encontravam-se em processo de diferenciação. Assim, não foi surpresa observar que com onze semanas pós-transplante as células marcadas encontravam-se na fase de espermátides alongadas, as quais eventualmente formaram espermatozóides que, embora em pequeno número, foram encontrados no epidídimo do gato receptor, catorze semanas pós-transplante. Resta, no entanto, em estudos futuros, testar a fertilidade destes espermatozóides, através de técnicas fertilização *in vitro* (Pukazhenthil et al., 2006; Baudi et al., 2008). Outro aspecto que merece ser comentado quanto aos espermatozóides das duas espécies

de felídeos aqui investigadas, é que as diferenças observadas para as dimensões das cabeças dos espermatozoides, e mesmo para o comprimento do flagelo, não foram por nós consideradas suficientemente seguras para a distinção dos mesmos, impossibilitando assim, a utilização de marcadores morfológicos para a identificação dos espermatozoides de gatos domésticos e jaguatiricas.

Em síntese, os resultados do transplante xenogênico indicaram que as espermatogônias tronco de jaguatiricas foram capazes de colonizar os testículos de gatos domésticos adultos, se diferenciarem e formarem espermatozoides, após passarem pelas três distintas fases do processo espermatogênico, nas quais diferentes e importantes eventos ocorrem, tais como: a) intensa atividade mitótica (fase espermatogonial ou proliferativa); b) última síntese de DNA e recombinação gênica (fase meiótica ou espermatocitária); e c) condensação do núcleo, formação do flagelo e do acrossoma (fase espermiogênica ou de diferenciação). Conforme já é sabido, estas fases requerem intrincados mecanismos regulatórios (Sharpe, 1994; Hess & França, 2007) que, ao que parece, foram propiciados de maneira efetiva pelo ambiente testicular dos gatos domésticos receptores, que divergem filogeneticamente de jaguatiricas em somente cerca de dois milhões de anos (Johnson et al., 2006; Driscoll et al., 2007; O'Brien et al., 2008).

Do ponto de vista evolutivo é importante ser ressaltado que, de acordo com o estabelecido na literatura, a distância filogenética durante a evolução é um importante fator no sucesso do transplante xenogênico (França & Russell, 2000; Dobrinski, 2005). Assim, o transplante de espermatogônias entre espécies de roedores que são consideradas mais próximas filogeneticamente (ex: rato para camundongo que divergem cerca de 10-11 milhões de anos; Ogawa et al., 1999), resulta na formação de gametas viáveis (Shinohara et al., 2006; Kanatsu-Shinohara et al., 2008). Por outro lado, o transplante de espermatogônias tronco de animais domésticos de grande porte e mesmo de primatas para camundongos, distantes filogeneticamente em até cerca de 110 milhões de anos, resultou em somente colonização dos túbulos seminíferos de camundongos, sem ocorrer a diferenciação destas células (França & Russell, 2000; Dobrinski, 2005). A família Felidae é formada por 37 espécies descendentes de um gato de tamanho médio que existiu cerca de 10-11 milhões de anos atrás (O'Brien et al., 2008). Portanto, a partir dos resultados inéditos bastante promissores encontrados no presente estudo, envolvendo tanto o transplante singênico como o xenogênico de espermatogônias

tronco, podemos sugerir que o gato doméstico apresenta alto potencial para ser utilizado como animal receptor na preservação do genoma de felídeos selvagens.

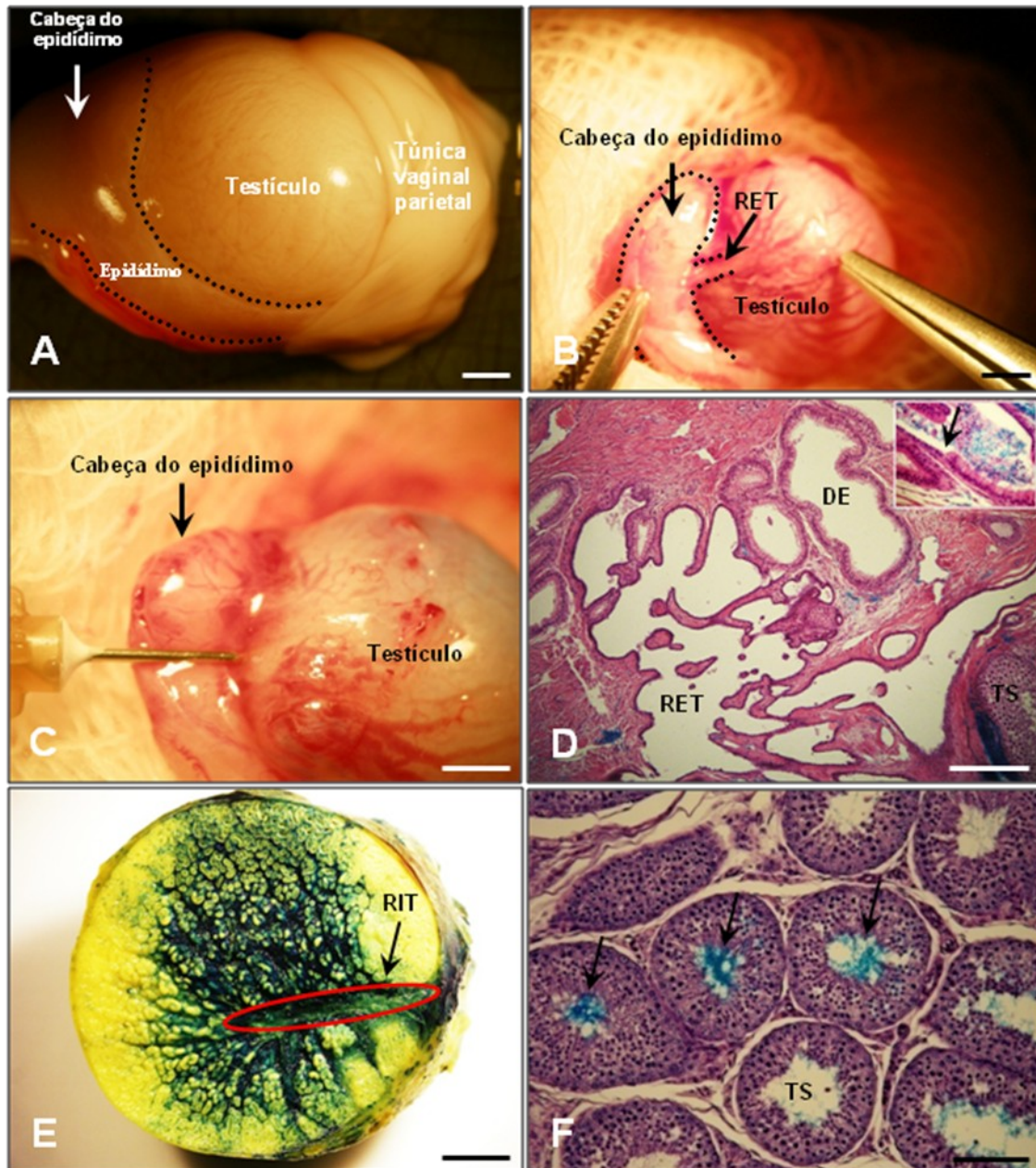


Figura 1. Padronização da via de injeção (*ex vivo* (A, D-F) e *in vivo* (B-C)) no testículo do gato doméstico. A) Note que o epidídimo (delimitado em preto por linha descontinua) está firmemente aderido ao testículo através da túnica albugínea. Para melhor visualização do testículo a túnica vaginal parietal foi rebatida em direção a cauda do epidídimo. B) Visualização do testículo após cuidadosa dissecação da túnica albugínea + túnica vaginal visceral com posterior liberação da cabeça do epidídimo e exposição da rede extratesticular (RET), (delimitados em preto por linha descontinua). C) Teste da eficiência da via de injeção utilizando-se agulha contendo tinta nanquim e inserida na rede extratesticular. D) Região de transição entre o ducto eferente (DE) e a rede extratesticular (RET). O detalhe mostrado no canto superior direito desta figura indica a região de transição (seta) entre a rede extratesticular (epitélio cuboidal) e o ducto epididimário (epitélio colunar). Também indicado nesta figura encontra-se um túbulo seminífero (TS). E) Secção transversal do testículo mostrando a rede intratesticular (RIT) delimitada em vermelho, e inúmeros túbulos seminíferos preenchidos em graus variados pela tinta nanquim. F) Secção transversal de túbulos seminíferos (TS) indicando a presença da tinta nanquim no lúmen (setas) e também mostrando o sucesso do protocolo de injeção. Coloração com HE (E-F). Barras: A-C e E, 2 mm; D, 200µm; F, 100µm.

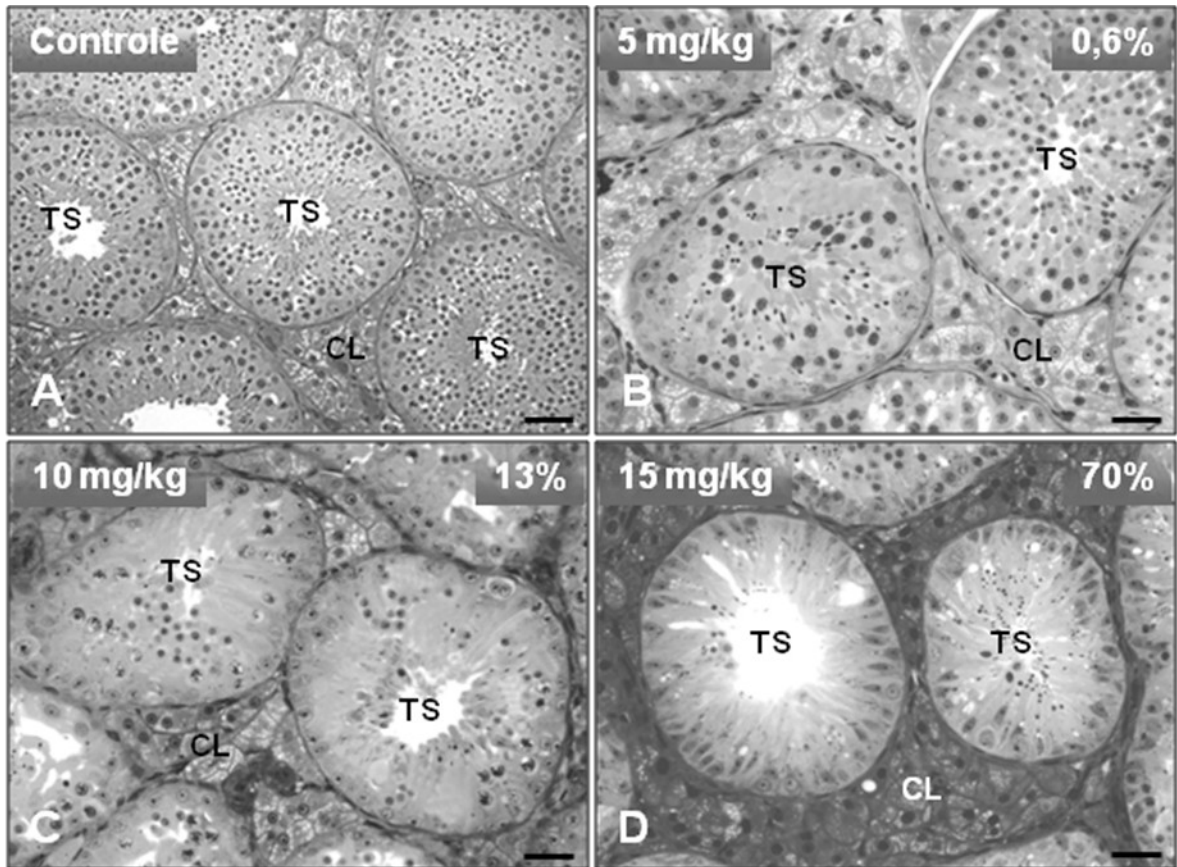


Figura 2. Secções transversais de túbulos seminíferos (TS) de gatos controle (A) e tratados com diferentes doses (5, 10 e 15mg/kg de peso corporal) de busulfan (B-D) e orquiectomizados 40 dias após a injeção. Observe que o número de células germinativas diminuiu gradativamente com o aumento da dose de busulfan injetada. Desta forma, o percentual de túbulos severamente afetados em relação à quantidade de células germinativas por secção transversal de túbulo variou de 0,6 a 70%. Um aspecto que realça a diminuição de células germinativas devido ao tratamento com busulfan é o aumento relativo do compartimento ocupado pelas células de Leydig (CL) nos gatos tratados, conforme evidenciado na Figura B-D. Barra = 50 μ m.

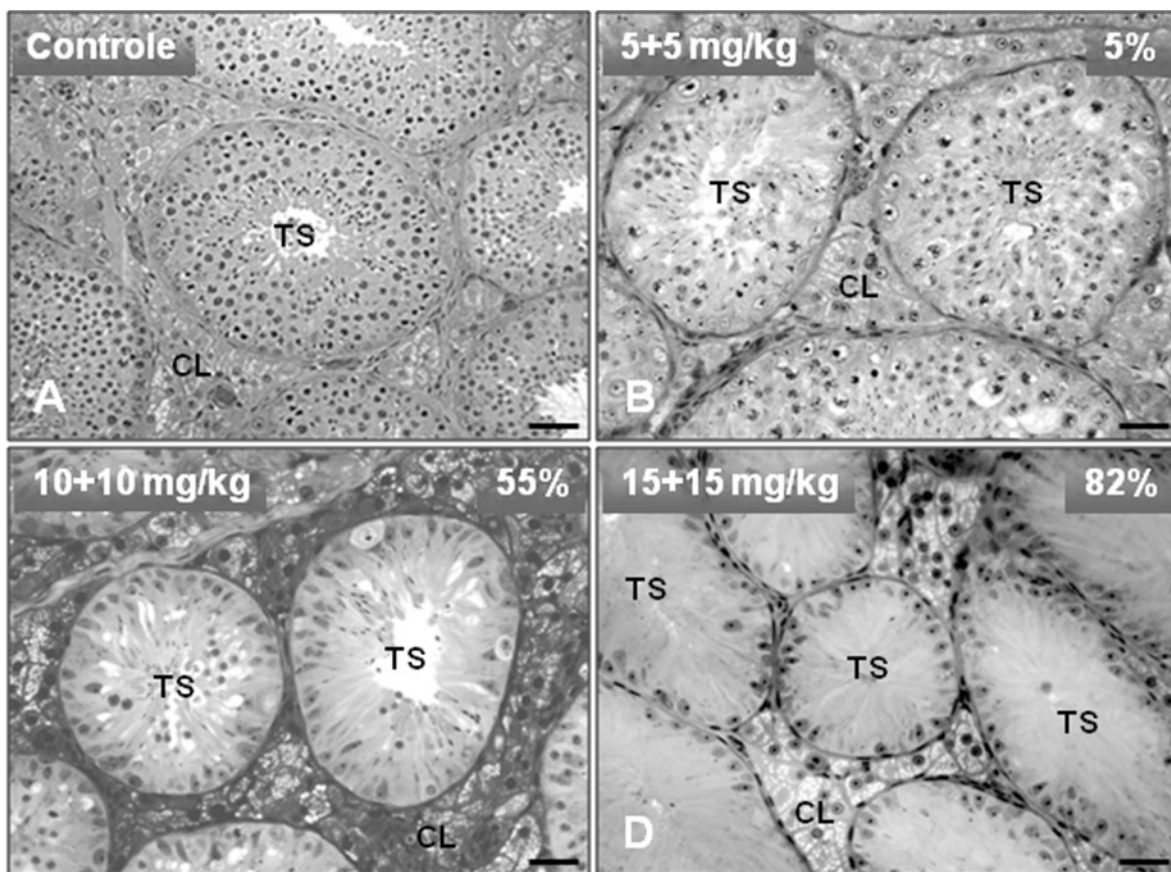


Figura 3. Secções transversais de túbulos seminíferos (TS) de gatos controle (A) e tratados com diferentes doses (5+5, 10+10 e 15+15 mg/kg de peso corporal) de busulfan (B-D) e orquiectomizados 40 dias após a primeira injeção. À semelhança do tratamento com somente uma dose, também ocorreu diminuição gradativa e dose-dependente do número de células germinativas nos gatos tratados com o quimioterápico. Assim, o percentual de túbulos severamente afetados quanto ao número de células germinativas por secção transversal de túbulo variou de 5 a 82%. Em comparação com o controle, o percentual ocupado pelas células de Leydig (CL) também foi maior nos gatos tratados. Barra = 50µm.

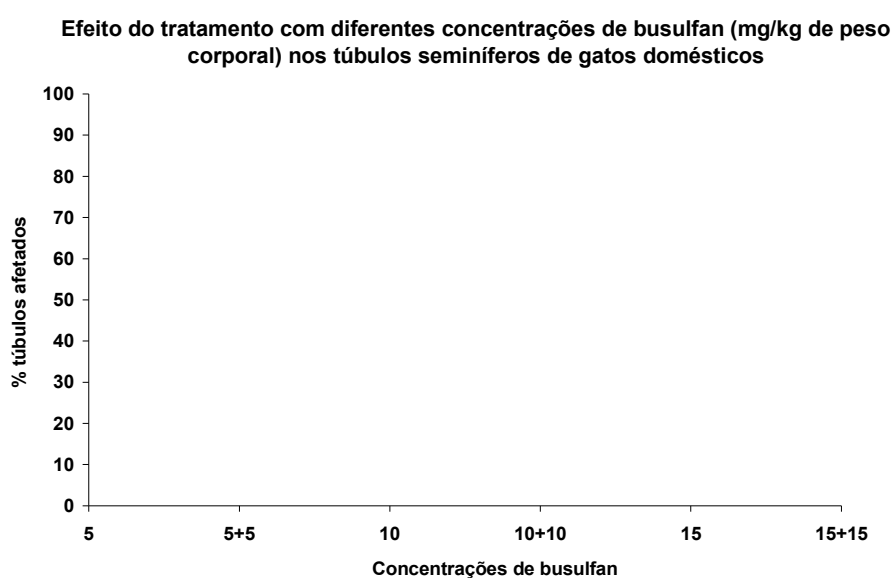


Figura 4. Percentual de túbulos seminíferos afetados em graus variados pelo tratamento com busulfan. Observe o nítido efeito dose-dependente do tratamento na depleção das células germinativas presentes nos túbulos seminíferos de gatos domésticos sexualmente maduros.

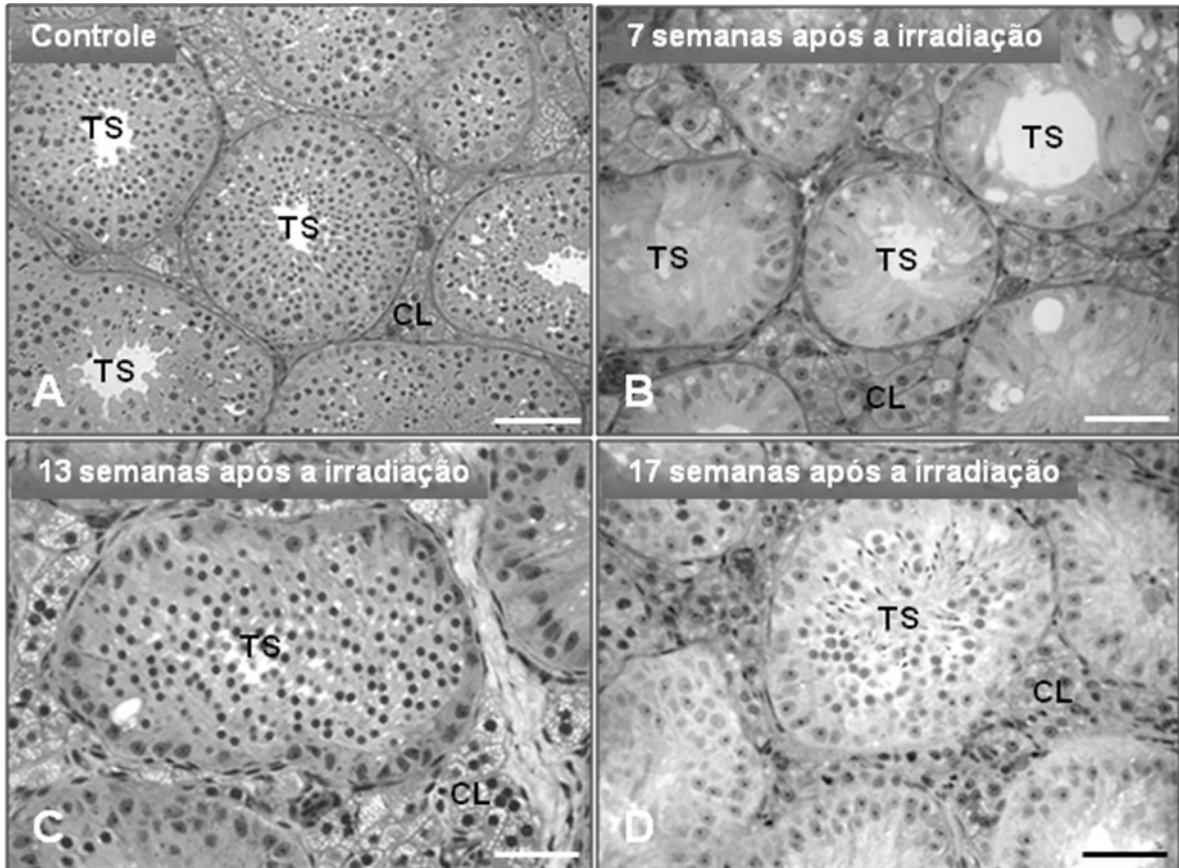


Figura 5. Secções transversais de túbulos seminíferos (TS) de gatos controle e irradiados e orquiectomizados em diferentes intervalos de tempo pós-irradiação (B-D). B) Observe que, mostrando a grande eficiência do tratamento, sete semanas após a irradiação quase todos os túbulos (~97%) estavam desprovidos de células germinativas e somente alguns deles (~3%) apresentavam espermatogônias. Ainda em decorrência deste tratamento, as células de Leydig (CL) ocupavam grande percentual do parênquima testicular. C) Nos gatos avaliados treze semanas após a irradiação houve recuperação da espermatogênese endógena em cerca de 1/4 dos túbulos seminíferos e o tipo de célula germinativa mais avançada foi a espermátide alongada que estava presente em aproximadamente 1% dos túbulos examinados. D) Com 17 semanas após a irradiação a recuperação da espermatogênese endógena estava mais evidente e quase 40% dos túbulos apresentavam células germinativas em graus variados, incluindo-se aí espermátides alongadas (~5%). Barra = 100µm.

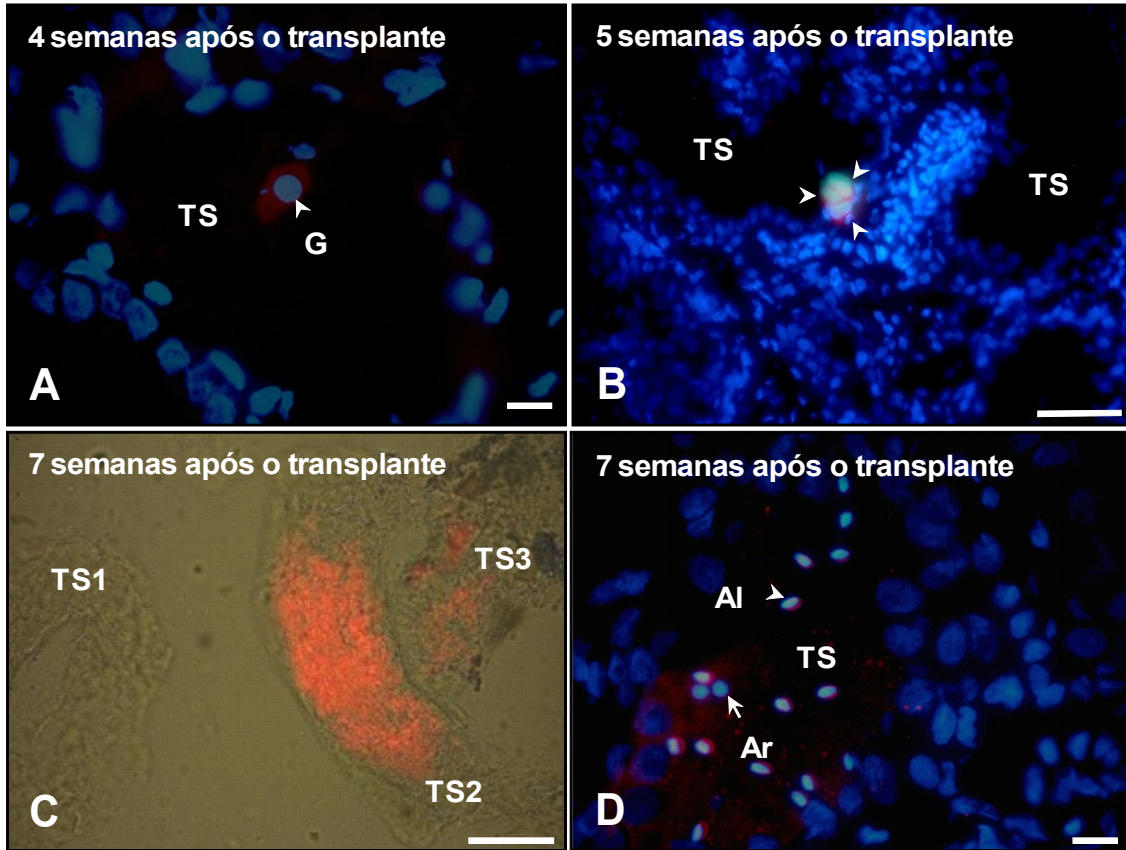


Figura 6. Células germinativas marcadas com PKH26 presentes nos túbulos seminíferos (TS) de gatos receptores avaliados em diferentes períodos de tempo pós-transplante. A) Imagem sobreposta obtida a partir de marcação em azul do núcleo (cabeça de seta) com DAPI e da membrana celular em vermelho com PKH26, 4 semanas pós-transplante. A célula indicada apresenta morfologia semelhante à de espermatogônia de gato. B) Com 5 semanas após o transplante, aglomerado de células marcadas pelo DAPI e PKH26 (cabeça de seta) era observado no epitélio dos túbulos seminíferos. C) Túbulos seminíferos após digestão enzimática parcial de testículo de gato avaliado 7 semanas pós-transplante. Observe evidente área de colonização marcada em vermelho pelo PKH26 ao longo de grande parte de TS2, e em menor intensidade em TS3. D) Secção de túbulo seminífero avaliada 7 semanas após o transplante onde se observa espermátides arredondadas (Ar, seta) e alongadas (Al, cabeça de seta) marcadas pelo DAPI e PKH26. Barras: A e D = 10µm; B e C = 100µm.

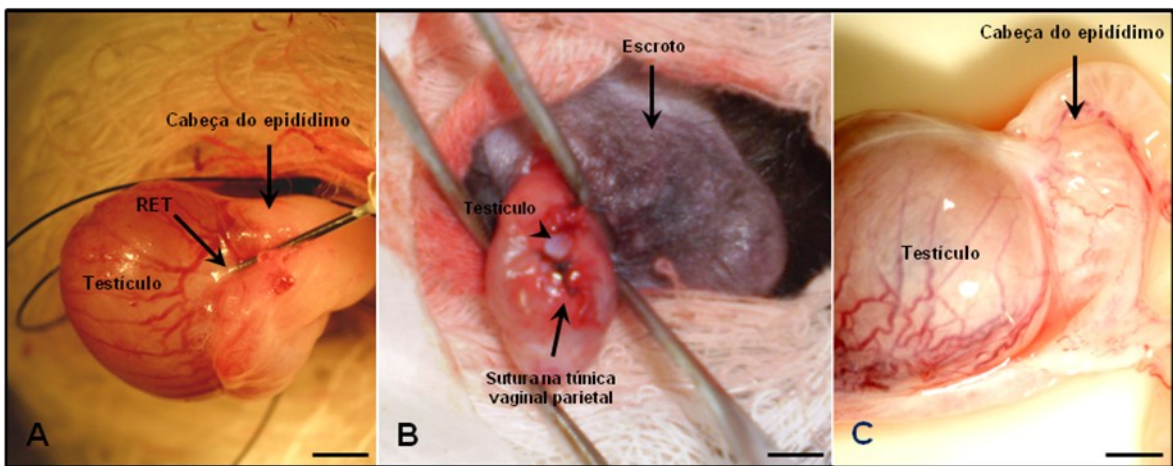
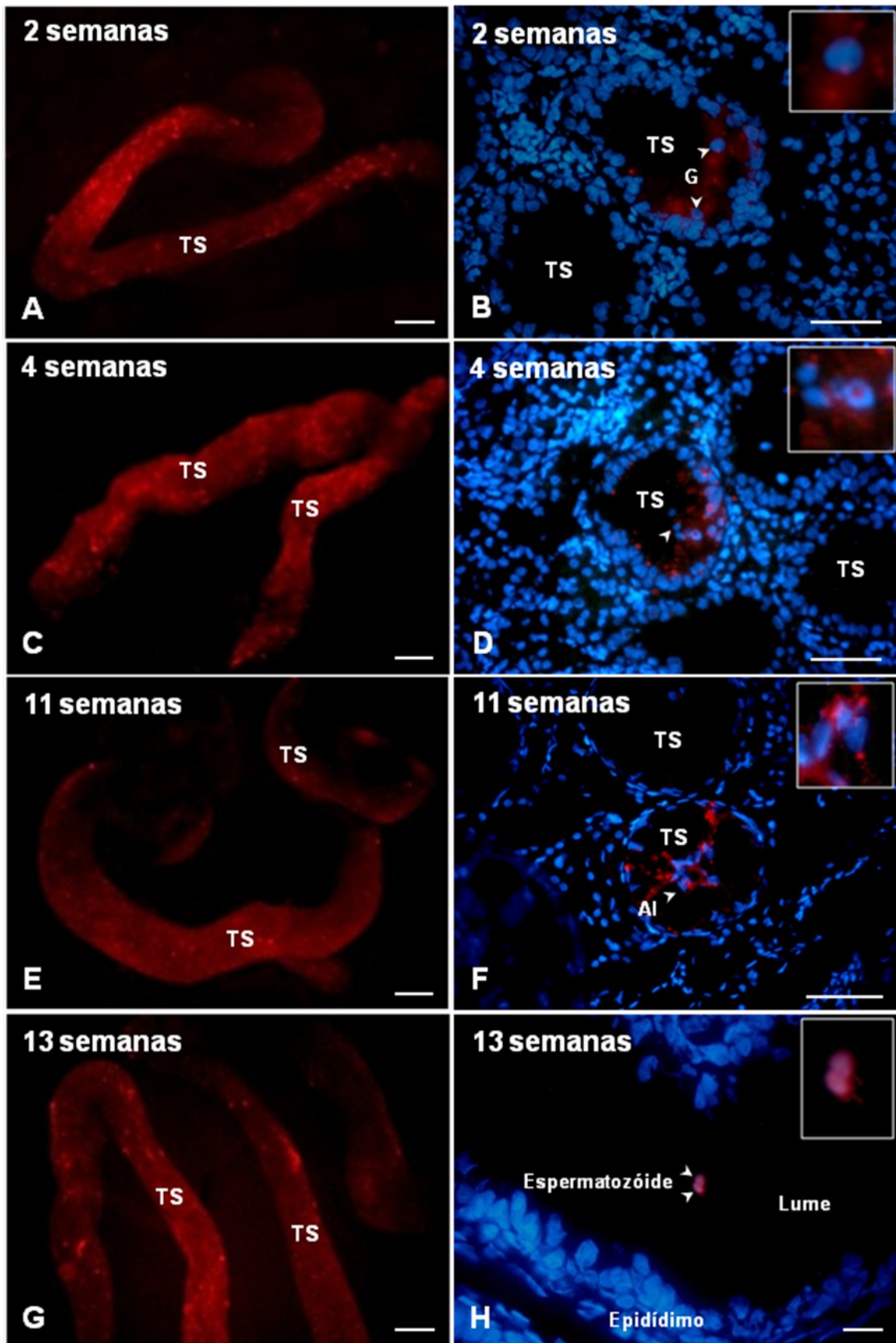


Figura 7. Procedimentos utilizados para o transplante xenogênico (jaguaririca - gato doméstico). A) Introdução de agulha para a injeção das espermatogônias tronco de jaguaririca adulta na rede extratesticular (RET) de gato doméstico sexualmente maduro. Observe que a rede extratesticular fica situada logo abaixo do pedículo vascular que apresenta forma arqueada. B) Ilustração da sutura da túnica vaginal parietal (seta) que envolve o testículo (cabeça de seta). Note que este conjunto ainda se encontra fora do escroto situado logo acima. C) Testículo e epidídimo de gato doméstico quatro semanas após o transplante. Observe que este órgão apresenta aparência normal. Barras: A e C = 2 mm; B = 1,2 mm.

Figura 8. Transplante de espermatogônias de jaguatiricas para os testículos de gatos domésticos avaliados em diferentes períodos de tempo. As imagens de túbulos seminíferos (A-G) e ducto epididimário (H) mostradas foram obtidas a partir de digestão enzimática parcial de testículos de gatos (A, C, E, G) e de sobreposição de marcação do núcleo com DAPI (em azul) e da membrana celular com o corante fluorescente PKH26 (em vermelho) (B, D,F), estas últimas obtidas em cortes de congelção. Nos túbulos seminíferos isolados (TS) observam-se regiões onde ocorreram colonizações das células de jaguatirica transplantadas e marcadas pelo PKH26, entre duas a treze semanas pós-transplante. Nos mesmos intervalos de tempo, as imagens sobrepostas mostram epitélio seminífero contendo células germinativas transplantadas que se encontram em diferentes fases da espermatogênese. Podendo ser evidenciadas, por exemplo, células com morfologia semelhante a espermatogônia (G) e espermátides alongadas (A) indicadas na Figura 8B e F, respectivamente. Estes tipos celulares mencionados estão também mostrados em maior aumento no canto superior direito da Figura 8B, D, e F. Já na Figura 8H observa-se a presença de espermatozoides marcados com PKH26 e localizados no lume do ducto epididimário, espermatozoides estes também ilustrados em maior aumento no canto superior direito desta figura. Barras: A, C, E, e G = 10 μ m; B, D, F, e H =100 μ m.



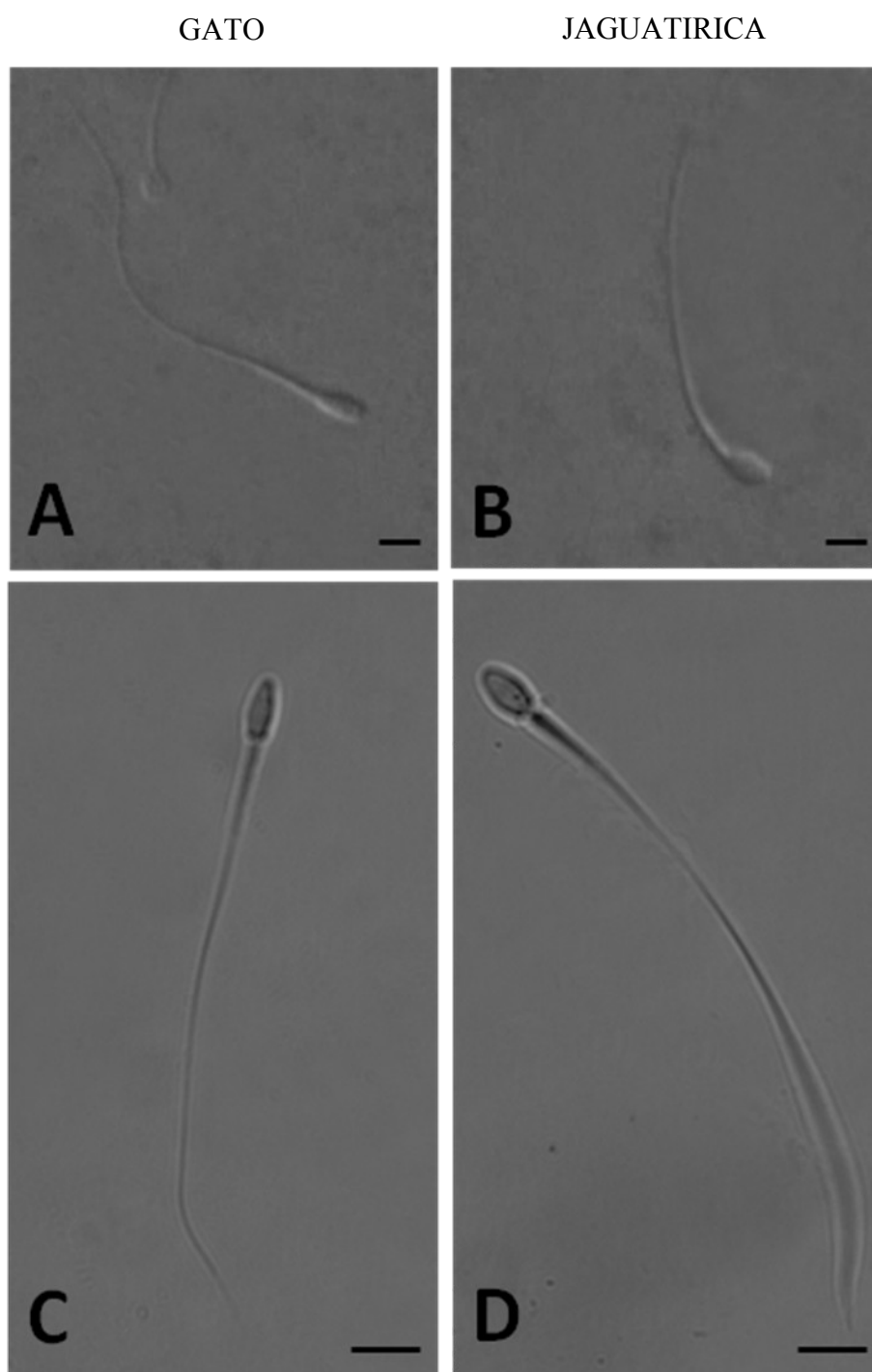


Figura 9. Imagens de espermatozoides de gatos domésticos (A e C) e de jaguatiricas (B e D), obtidas através de microscopia de interferência diferencial (A e B) e de microscopia de luz convencional (C e D). Conforme pode ser notado, não foram encontradas diferenças marcantes na morfologia destes gametas entre estas duas espécies de felinos. Barra = 5 µm.

Tabela 1. Biometria e morfometria do testículo em gatos domésticos tratados com busulfan e orquiectomizados 40 dias após o início do tratamento.

Parâmetros	Dose de busulfan mg/kg de peso corporal													
	5		5 + 5*		10		10 + 10*		15		15 + 15*		Média ± EPM	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Peso corporal (Kg)	3,60#	3,52	4,15	4,30	4,45	4,41	3,70	3,67	4,30	4,30	4,30	3,92	4,08 ± 0,14	4,02 ± 0,16
Peso testicular (g)	1,27	1,07	1,09	1,16	0,88	1,02	0,75	0,66	1,45	1,63	1,17	0,69	1,1 ± 0,1	1,04 ± 0,14
Índice gonadossomático (%)	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04	0,07	0,07	0,05	0,04	0,06 ± 0,006	0,05 ± 0,005
% de túbulos afetados	0,0	0,6	0,0	4,9	0,0	13,0	0,0	55,0	0,0	70,0	0,0	81,7		
Proporção volumétrica (%)														
Compartimento tubular	83,8	72,9	82,4	70,4	84,5	84,0	85,9	72,7	86,9	78,4	86,7	75,5	85,0 ± 0,7	75,7 ± 2,0**
Compartimento intertubular	16,2	27,1	17,6	29,6	15,5	16,0	14,1	27,3	13,1	21,6	13,3	24,5	15,0 ± 0,7	24,3 ± 2,0**
Célula de Leydig	13,8	24,2	14,5	27,0	12,7	13,2	11,1	24,0	10,8	19,3	11,1	22,2	12,3 ± 0,6	21,7 ± 1,9**
Diâmetro tubular (µm)	257	234	199	193	225	210	258	184	210	176	213	179	227 ± 10	196 ± 9**
Altura do epitélio seminífero (µm)	99	86	84	76	84	79	99	70	71	63	84	72	87 ± 4	75 ± 3**
Volume da célula de Leydig (µm ³)	3398	5773	2871	5408	3093	5610	3934	4400	2601	4728	3603	6725	3294 ± 200	5540 ± 335**
Célula de Leydig/testículo (10 ⁹)	33	34	41	40	26	24	29	35	34	33	25	27	31,2 ± 2,4	32,2 ± 2,4

* O intervalo de tempo entre a primeira e a segunda injeção foi de vinte dias. # Os valores mostrados para o controle e tratado referem-se aos dados obtidos para o mesmo animal no início e final do tratamento. ** Denota significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 2. Biometria e morfometria do testículo de gatos domésticos irradiados (1,5 Gy + 8 Gy) e orquiectomizados em diferentes intervalos de tempo (semanas) pós-irradiação (média ± EPM).

Parâmetros	Controle* (n = 13)	7 semanas (n = 3)	13 semanas (n = 3)	17 semanas (n = 3)
Peso corporal (kg)	3,1 ± 0,2	4,3 ± 0,38	3,3 ± 0,36	3,2 ± 0,21
Peso do testículo esquerdo (g)	1,16 ± 0,1	0,68 ± 0,07	0,54 ± 0,04	0,49 ± 0,03
Peso do testículo direito (g)	1,18 ± 0,09	0,69 ± 0,09	0,51 ± 0,05	0,48 ± 0,04
Índice gonadossomático (%)	0,078 ± 0,07	0,03 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,03 ± 0,0
% células germinativas nos túb. semin.				
Espermatogônias		3,5 ± 0,9	4,5 ± 1,3	0,6 ± 0,4
Espermatócitos primários		0	13,3 ± 8	27,7 ± 5,1
Espermátides arredondadas		0	3,2 ± 2,6	3,9 ± 1,6
Espermátides alongadas		0	0,6 ± 0,4	5,2 ± 2
Somente célula de Sertoli		96,5 ± 0,9	78,4 ± 10,7	62,6 ± 4,9

* Refere-se aos gatos domésticos utilizados nos estudos desenvolvidos por França & Godinho, 2003.

Referências bibliográficas

Aponte PM, Van-Bragt MA, De-Rooij DG, Van-Pelt AMM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* 2005; 113:727-42.

Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med* 1996; 2:693-6.

Barroca V; Lassalle B, Coureuil M, Louis JP, Page FL, Testart J, Allemand I, Riou L, Fouchet P. Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*. *Nat Cell Biol* 2009; 11(2):190-196.

Baudi DLK, Jewgenow K, Pukazhenthil BS, Spercoski KM, Santos AS, Reghelin ALS, Candido MV, Javorouski ML, Müller G, Morais RN. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology* 2008; 69:204-211.

Brinster CJ, Ryu BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL, Orwig KE. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod* 2003; 69:412-420.

Brinster RL & Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11303-7.

Brinster RL & Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11298-302.

Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296:2174-75.

Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science* 2007; 316:404-5.

Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987; 178:259-68.

Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996; 381:418-21.

Creemers LB, Meng X, den Ouden K, Van Pelt AM, Izadyar F, Santoro M, Sariola H, de Rooij DG. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod* 2002; 66:1579-84.

de Ruiter-Bootsma AL, Kramer MF, de Rooij DG, Davids JAG. Survival of spermatogonial stem cells in the mouse after split-dose irradiation with fission neutrons of 1-MeV mean energy or 300 kV X rays. *Radiat Res* 1977; 71:579-592.

Dobrinski I & Travis AJ. Germ cell transplantation for the propagation of companion animals, non-domestic and endangered species. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19(6):732-9.

Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57:270-9.

Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 61:1331-39.

Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:137-145.

Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Roca AL, Hupe K, Johnson WE, Geffen E, Harley EH, Delibes M, Pontier D, Kitchener AC, Yamaguchi N, O'Brien SJ, Macdonald DW. The near eastern origin of cat domestication. *Science* 2007; 317:519-523.

Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11287-11289, November 1994.

França LR & Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003; 68:1554-61.

França LR & Russell LD. Spermatogonial transplantation in mammals. *Ann Rev Biomed Sci* 2000; 2:61-76.

Furuya T. Onset of compensatory hypertrophy of interstitial tissue and leydig cells in rats hemicastrated around the time of puberty. *Biol Reprod* 1990; 42:491-498.

Herrid M, Davey JD, Hill JR. Characterization of germ cells from pre-pubertal bull calves in preparation for germ cell transplantation. *Cell Tissue Res* 2007; 330:321-329.

Hess RA & França LR. Spermatogenesis. Cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY, editor. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Landes Bioscience, 2007, pp.1-15.

Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev* 2003b; 64:422-428.

Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, Blash S, Ayres S, Azuma C, Echelard Y, Dobrinski I. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl* 2005; 26(6):698-705.

Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod* 2003a; 69:1260-1264.

Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod* 2002; 66:21-28.

Izadyar F, DenOuden K, Stout TAE, Stout J, Coret J, Lankveld DPK, Spoormakers TJP, Colenbrander B, Oldenbroek BJK, Van der Ploeg KD, Woelders H, Kal HB, de Rooij DG. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2003; 126:765-774.

Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, Stephen J, O'Brien SJ. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* 2006; 311:73-77.

Kanatsu-Shinohara M, Muneto T, Lee J, Takenaka M, Chuma S, Nakatsuji N, Horiuchi T, Shinohara T. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol Reprod* 2008; 78:611-617.

Kashiwaki N, Yamaguchi R, Uesugi R, Hishiyama N, Kim M, Nakatsukasa E, Kogima Y, Okuda Y, Hisamatsu S, Inomata T, Shino M. Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididimal spermatozoa in the domestic cats. *J Repro Dev* 2005; 51:735-739.

Khaira H, Mclean D, Ohl DA, Smith GD. Spermatogonial stem cell isolation, and transplantation. *J Androl* 2005; 26:442-450.

Kim Y, Selvaraj V, Dobrinski I, Lee H, McEntee MC, Travis AJ. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. *J Androl* 2006; 27:248-256.

Kim Y, Turner D, Nelson J, Dobrinski I, McEntee M, Travis AJ. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in dog. *Reproduction* 2008; 136:823-831.

Lacerda SMSN, Batlouni SR, Assis LH, Resende FM, Campos-Silva SM, Silva RC, Segatelli TM, França LR. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybiurn, Intern J Ichthyol* 2008; 32(2):115-118.

Lacerda SMSN, Batlouni SR, Silva SBG, Homem CSP, França LR. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Animal Reproduction* 2006; 3(2):146-159.

Lucas B, Fields C, Hofmann MC. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87:35-42.

Luo J, Megee S, Rathi R, Dobrinski I. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Mol Reprod Dev* 2006; 73(12):1531-40.

McLean DJ. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res* 2005; 322:21-31.

Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi I. Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. *J Androl* 2000; 21:464-469.

Mikkola M, Sironen A, Kopp C, Taponen J, Sukura A, Vilkki J, Katila T, Andersson M. Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. *Reprod Domest Anim* 2006; 41:124-128.

Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Reprod* 1999; 60:1429-36.

Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol Reprod* 2001; 64:1409-1416.

Nagano M, Uchikura K, Takahashi Y, Hishinuma M. Effect of duration of in vitro maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. *Theriogenology* 2008; 69:231-236.

Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell* 2007; 12:195-206.

O'Brien SJ & Johnson WE. Big cat genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005; 6:407-29.

O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, Pontius J, Pecon-Slattery J, Menotti-Raymond M. State of cat genomics. *Trends Genet* 2008; 24 (6):268-279.

Oatley JM & Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24:263-86.

Oatley JM, Tibary A, de Avila DM, Wheaton JE, McLean DJ, Reeves JJ. Changes in spermatogenesis and endocrine function in the ram testis due to irradiation and active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *J Anim Sci* 2005; 83:604-612.

Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster R. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41:111-22.

Ogawa T, Dobrinski I, Brinster RL. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell* 1999; 31(5):461-472.

Ohta H, Yomogida K, Yamada S, Okabe M, Nishimune Y. Real-time observation of transplanted 'green cells': proliferation and differentiation of stem cells. *Dev Growth Differ* 2000; 42:105-12.

Parreira GG, Ogawa T, Avarbock MR, França LR, Brinster RL, Russell LD. Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod* 1998; 59:1360-70.

Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenti B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* 2006; 66:37-48.

Pukazhenti BS, Neubauer K, Jewgenow K, Howard J, Wildt DE. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 2006; 66:112-121.

Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology* 2006; 66:2091-2103.

Rodriguez-Sosa JR, Silvertown JD, Foster RA, Medin JA, Hahnel A. Transduction and transplantation of spermatogonia into the testis of ram lambs through the extra-testicular rete. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44(4):612-20.

Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K. Testicular stem cells for fertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(2):274-80.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994:1363-1434.

Shinohara T, Kato M, Takehashi M, Lee J, Shinichiro Chuma S, Nakatsuji N, Kanatsu-Shinohara M, Hirabayashi M. Rats produced by interspecies spermatogonial transplantation in mice and in vitro microinsemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(37):13624–13628

Silva RC, Costa GMJ, Andrade LM, França LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). Papers in press. *Theriogenology* 2009. DOI:10.1016.

Stellflug JN, Green JS, Leathers CW. Antifertility effect of busulfan and procarbazine in male and female coyotes. *Biol Reprod* 1985; 33:1237-1243.

Zhang Z, Shao S, Meistrich ML. The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *J Cell Physiol* 2007; 211:149-158.

