NAIRA CAROLINE GODOY PIERI

**Espermatogênese Xenogênica Pós-Transplante de Células Tronco
Caninas no Testículo de Camundongos**

São Paulo
2016

NAIRA CAROLINE GODOY PIERI

Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Area de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3270
FMVZ

Pieri, Naira Caroline Godoy

Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos / Naira Caroline Godoy Pieri. -- 2016.
213 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins.

1. Espermatogônias. 2. Células tronco. 3. SSCs. 4. Cão. I. Título.

ERRATA

PIERI, N. C. G. **Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos**. 2016. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Página	Onde se lê	Leia-se
Capa	Espermatogênese Xenogênica Pós-Transplante de Células Tronco Caninas no Testículo de Camundongos	Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos", protocolado sob o nº 2549/2013, utilizando 60 (sessenta) camundongos, sob a responsabilidade da Dra. Daniele dos Santos Martins (FZEA), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Xenogeneic spermatogenesis after rick off canine stem cells in the testis of mice", protocol number 2549/2013, utilizing 45 (forty five) mice, under the responsibility Dra. Daniele dos Santos Martins (FZEA), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 8 de janeiro de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PIERI, Naira Caroline Godoy

Título: Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esta pesquisa aos meus pais Maria
Cristina de Godoy Pieri e Wilson Donizete
Pieri e ao meu namorado, amigo e
companheiro Antonio Toffoli Neto.

Aos longos destes 4 anos de doutorado, muitas pessoas passaram pela minha vida, acredito que o doutorado seja isso mesmo, é nele que agregamos um maior número de pessoas, e claro fazemos contatos seja para afins acadêmicos ou amizade.

E comigo não foi diferente, tenho que agradecer muitas, mas muitas pessoas, pois uma pesquisa nunca se faz sozinha e está com certeza não foi diferente. Bem, nem sei como iniciar, primeiramente quero agradecer aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, e sendo meu alicerce, meu leme. Ao meu Namorado, futuro marido e pais dos meus filhos (rsrs); Antonio Toffoli Neto, por todos os motivos do mundo, por me aguentar chorando e falando que experimento não vai dar certo, por seu melhor amigo e companheiro, e por me ajudar e incentivar nestes quatros anos.

Quero agradecer a Profa. Daniele (Dani), por me acolher desde o primeiro dia, e confirmar em mim e me ajudar todas as vezes que eu precisei. Hoje, posso dizer que apreendi muito e ela faz parte deste ensinamento, na aula com ratos nem se fale. E ao Prof. Carlos Ambrósio (Caju), que me ensinou a ser firme nas minhas decisões e trabalhar em grupo, e por me acolher nesta instituição.

Bem agora, gostaria de agradecer as três maletinhas, e amigas da minha vida, Juliana, Ana Mançanares (Mança) e Arina (Nina). A Juliana, por ter me acolhido como uma mãe, desde o dia que pisei na FZEA, sabe quando o "Santo" bate, então tudo começou assim. E quero que continue por muitos anos. A Mança, acho que metade deste doutorado só foi feito com ajuda dela, por isso tenho que agradecê-la, e ao pretinho (carro). Ela sempre me aconselhou, me deu vários, puxões de orelha, empurrão, prestatenção e tenho que agradecê-la pela amizade que só fortaceu. A Nina eu só tenho que dizer muito, muito obrigada, o que seria de mim, sem ela me ajudando com os ratos e muitas com muitas outras coisas (esta frase merece uma canção.. rsrs) minhas manhãs de terças e sextas sempre eram animadas, momento fofoca, e discussão sempre, além dos papos na casa da mança, esse trio é fogo.

Quero agradecer a toda família LLMD, em especial ao Hugo, pois sem ele metade destes experimentos não seriam feitos, e pelas discussões e ajuda no PCR, a Dra. Fabiana Bressan por sempre me auxiliar e socorrer nas horas mais difíceis a Lidia, por me ajudar e me ensinar imuno, apreendi muito com ela, pela amizade e carinho, sempre que estamos juntas colocamos o papo em dia. Ao meu amigo e vizinho Rodrigo Barreto, por toda ajuda no começou e que me ensinou muitas coisas, e pela paciência. A Dra. Lilian por toda ajuda e incentivo no inicio desta jornada

A Yonara e ao Camara de Bem, pela ajuda na técnica de karyotipo, ao Pedro pela ajuda no PCR, em especial gostaria de agradecer a Angela e ao Prof. Mario Binelli, por me

receber em seu laboratório, ajuda no PCR, que não foi fácil. A Aline por me auxiliar no início do projeto, e a parceira na limpeza e manejo dos animais. Ao Nilton (Nirtão) que me aguentou, por longos dois anos, todos os dias juntos, e agradecer por tudo que ele me ensinou de como otimizar protocolos, (rsrs), por me ajudar, todas as vezes que precisei e eu sei que foram muitas.

A Kelly e as meninas do Caju (Natalia, Alessandra, Vanessa; Luciana) e ao meu amigo Cury. A Kelly pela ajuda nas correções e artigos (somos boas juntas!) e ao meu caro amigo Cury, pelo seu jeito calmo de lidar com as coisas, que muitas vezes é necessário e também pelos conselhos.

A Patricia e aos funcionários do Laboratorio de Citrometria de fluxo do hemocentro da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto e ao Dr. Dimas, por nos receber tão bem e ajudar com as análises de citometria de fluxo.

Aos meus amigos e colegas do FZEA e LMMD, este trabalho com certeza não teria sido realizado sem ajuda de cada um de vocês, sempre disse que a lista seria enorme! Agradeço novamente por tudo. (Juliano Sangalli, Gabriele Mamede, Rafa Sampaio, Fernanda, Maite, Juliano Silveira; Pamela, Pedrinho e a Lais).

A Fapesp (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) por todo apoio financeiro dado a esta pesquisa.

No final ao parar e pensar em tudo que fiz no doutorado, quantas coisa apreendi com cada um, quantas técnicas, quantas pessoas conheci, eu tenho um único sentimento o de um vencedor. E eu posso afirmar, que com a ajuda de todos faria com certeza tudo novamente. Portanto, para terminar pensei em uma música que reflete tudo isso.

*“ Olha lá, quem vem do lado oposto, vem sem gosto de viver,
Olha lá, que os bravos são, Escravos são e salvos de sofrer.
Olha lá, quem acha que perder, É ser menor na vida, Olha lá,
quem sempre quer vitória, E perde a glória de chorar, Eu que
já não sou assim, Muito de ganhar, Junto as mãos ao meu
redor, Faço o melhor que sou capaz, Só pra viver em paz”.*
(Los Hermanos- O vencedor).

“Vim, vi, venci”

RESUMO

PIERI, N. C. G. **Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos.** [Spermatogenesis xenogeneic after stem cell transplantation in canine testis of mice]. 2016. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As células tronco espermatogoniais (SSCs) são caracterizadas pela capacidade de autorrenovação, proliferação e transmissão das informações genéticas. Em caninos a primeira tentativa de xenotransplante não obteve o sucesso da produção de espermatozoides, no entanto, há evidências de que as células testiculares xenogênicas podem ser transplantadas no testículo do animal hospedeiro, e gerar espermatozoides viáveis do doador. Portanto, este estudo tem como objetivo realizar o xenotransplante das células germinativas caninas em camundongos imunossuprimidos, e com isto promover à produção de espermatozoides caninos viáveis, geneticamente modificados. E por meio desta técnica, analisar a eficiência da espermatogênese pós-transplante. Células germinativas testiculares foram caracterizadas, isoladas e cultivadas de cães pré-púberes, por meio de sistemas de cultura de enriquecimento e fatores de crescimento. As células foram transduzidas com um gene repórter GFP e LacZ, e por um vetor lentiviral para indentificar as SSCs nos testículos receptores. As SSCs transduzidas foram transplantadas nos testículos de camundongos (C57BL/6) tratados com Busulfan, após diferentes períodos os animais receptores foram eutanasiados e analisados. Aos 10 dias de cultivo as células germinativas adultas foram positivas para CD49f, CD117, e com 5 dias uma expressão semelhante de GFRA1 e DAZL, demonstrando a presença de SSCs e algumas células em meiose. Transplantamos 10^5 células e 20-43% das células transplantadas foram identificadas na membrana basal dos túbulos seminíferos do animal receptor. Portanto, o transplante das células germinativas caninas, mostrou que a purificação e o cultivo realizados são possíveis para obter SSCs caninas, as quais colonizaram os túbulos seminíferos dos camundongos imunodeficientes e mantiveram-se vivas na membrana basal por 90 dias após transplante, mesmo que estes animais tenham distância filogenética.

Palavras-chave: Espermatogônias. Células tronco. SSCs. Cão.

ABSTRAT

PIERI, N. C. G. **Spermatogenesis xenogeneic after stem cell transplantation in canine testis of mice.** [Espermatogênese xenogênica pós-transplante de células tronco caninas no testículo de camundongos]. 2016. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The spermatogonial stem cells (SSCs) are characterized by the capacity for self-renewal, proliferation and transmission of genetic information. In canines the first attempt to xenotransplantation did not achieve the success of sperm production. However, there is evidence that testicular xenogeneic cells can be transplanted into the testis of the host animal, and generate viable sperm donor. Therefore, this study aims conduct xenotransplantation of the canine germ cells in immunosuppressed mice, and thereby promote the production of viable sperm canines, genetically modified. And by this technique, analyze the efficiency of post-transplant spermatogenesis. Testicular germ cells were identified, isolated and cultured prepuberes dogs through enrichment culture systems and growth factors. Cells were modificated with a reporter gene GFP and LacZ. The SSCs canine was transplanted in mice (C57Bl/6), after different period and then the recipient animals were euthanized and analyzed. After 10 days in culture the germ cells were positive for CD49f, CD117, and 5 days a similar expression of GFRA1 and DAZL was observed, demonstrating the presence of SSCs and some cells in meiosis. 10^5 cells were transplanted and 20-43% of the transplanted cells were identified in the basement membrane of the seminiferous tubules after 90 days after transplantation. Therefore, the transplantation of canine germ cells showed that the cultivation and purification are performed possible for canine SSCs, it can colonize the seminiferous tubules the mice infertility remained alive in the basement membrane for 90 days after transplanting, even though these animals have phylogenetic distance.

Keywords: Spermatogonia.Stem cells. SSCs. Dog.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema comparativo do processo de autorrenovação e proliferação da população de espermatoγονial de mamíferos e cães	36
Figura 2 - Regulação da expressão GDNF em células de Sertoli	41
Figura 3 - Esquema da estrutura dos testículos de mamíferos.....	47
Figura 4 - Delineamento experimental	56
Figura 5 - Delineamento Experimental.....	59
Figura 6 - Esquema da validação do primer.....	62
Figura 7 - Fotomicrográφias do cultivo das células embrionárias caninas	66
Figura 8 - Análise de Citometria de fluxo das células embrionárias após 30 dias de cultivo	67
Figura 9 - Cultura das células embrionária caninas com adição de acido retnóico	68
Figura 10 - Expressão Gênica do DAZL	69
Figura 11 - Expressão Gênica do STRA8	70
Figura 12 - Análise da citometria de fluxo das células embrionárias, coletadas do embrião (1cm), após 10 dias de cultivo com e sem adição de all trans ácido retinóico	71
Figura 13 - Análise da citometria de fluxo das células embrionárias, coletadas do embrião (1,9 cm), após 10 dias de cultivo com e sem adição de all trans ácido retinóico.....	72
Figura 14 - Delineamento Experimental.....	77
Figura 15 - Cultivo das células tronco espermatoγονiais (SSCs) caninas	79
Figura 16 - Ilustração do gradiente descontínuo de percoll	81
Figura 17 - Fotomacro e fotomicrografias dos testículos caninos.....	86
Figura 18 - Fotomicrografias do cultivo das células SSCs caninas	87
Figura 19 - Fotomicrografias cultivo de células SSCs caninas	88

Figura 20 - Fotomicrografias células SSC caninas em cultivo	90
Figura 21 - Células SSCs caninas 0 e 10 dias de cultivo, após o enriquecimento com percoll e plaqueamento diferencial.....	92
Figura 22 - Fotomicrografias das células SSCs caninas.....	93
Figura 23 - Fotomicrografias da imunofluorescência dos testículos caninos com o marcador molecular CD49f	94
Figura 24 - Fotomicrografias da análise imunohistoquímica das proteínas C-kit (CD117t), DAZL e GFRA1 em testículos de cães pré-púberes	95
Figura 25 - Análise de citometria de fluxo com os marcadores CD49f, CD117 e CD90, aos 0, 5, 10, 15 e 30 dias de cultivo das células germinativas caninas.....	97
Figura 26 - Análise citometria de fluxo dos marcadores biomoleculares GFRA1 e DAZL	98
Figura 27 - Análise de citometria de fluxo com o marcador biomolecular CD49f (integrina alfa6) com 10 dias de cultivo	99
Figura 28 - Delineamento Experimental.....	106
Figura 29 - Imunolocalização dos marcadores de células germinativas no processo de espermatogênese canina.....	112
Figura 30 - Marcadores de células germinativas na população de espermatogônias caninas	112
Figura 31 - Análise imunohistoquímica do testículo de cães pré-púberes; púberes e adultos	113
Figura 32 - Células tronco espermatogoniais (SSC) em testículos de cães pré-púberes, púberes e adultos.....	114
Figura 33 - Caracterização das SSCs caninas em cultura nos dias 0, 5, 10 e 15 dias de cultivo	117
Figura 34 - Análise de Citometria de fluxo da expressão dos marcadores GFRA1, DAZL, OCT4, PLZF, C-kit, STRA8 de SSCs caninas em	

diferentes idades reprodutivas (pré-púberes e adultas) e tempo de cultivo	118
Figura 35 - Delineamento experimental	125
Figura 36 - Esquema da validação do primer.....	128
Figura 37 - Delineamento experimental	137
Figura 38 - Fotomicrografias dos testículos dos camundongos tratados com Busulfan.....	142
Figura 39 - Exame histológico e percentual dos 3 tipos de túbulos seminíferos em seção transversal de testículos de camundongos após tratamento com Busulfan	145
Figura 40 - Porcentual dos 3 tipos de túbulos seminíferos em seção transversal do testículos de camundongos após 4 semanas de tratamento com Busulfan.....	146
Figura 41 - Porcentual dos 3 tipos de túbulos seminíferos seção transversal em testículos camundongos após 6 semanas de tratamento com Busulfan.....	146
Figura 42 - Fotomicrografias da análise imunohistoquímica da proteína DAZL nos testículos dos camundongos tratados com Busulfan e controle	147
Figura 43 - Fotomicrografia análise imuno-histoquímico da proteína PLZF nos testiculos dos camundongos tratados com Busulfan.....	148
Figura 44 - Taxa de viabilidade (%) de espermatozoides aspirados do epidídimo após 4 e 6 semanas de tratamento com Busulfan vs controle	152
Figura 45 - Delineamento Experimental.....	158
Figura 46 - Técnica de microinjeção das células tronco espermatogonial (SSCs) caninas no ducto eferente dos camundongos C57Bl/6	161
Figura 47 - Fotomicrografia dos túbulos seminíferos dos camundongos pós transplante, células germinativas GFP+	164

Figura 48 - Média e a porcentagem de SSCs caninas GFP + encontradas no testículo de camundongos nos períodos de 25, 70 e 90 dias pós transplante	165
Figura 49 - Fotomacro e micrografias dos testículos do camundongo receptor 5 dias pós transplante das SSCs caninas (LacZ+)	166
Figura 50 - Fotomacro e micrografias dos testículos dos animais receptores das células germinativas caninas LacZ-positivas com 40, 70 e 90 dias pós transplante	166
Figura 51 - Fotomicrografias e análise da média de SSCs caninas GFP+ encontradas nos testículos camundongos receptores, 70 dias após transplante	173
Figura 52 - Fotomicrografias e análise da média de SSCs caninas GFP+ encontradas nos testículos camundongos receptores, 70 dias após transplante.....	176
Figura 53 - Análise de PCR do gene DNA α -satélite canino no epidídimo dos camundongos receptores	177

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Expressão gênica do DAZL em diferentes tempos de cultivo	69
Gráfico 2 - Expressão Gênica do STRA8 em diferentes tempos de cultivo	70
Gráfico 3 - Comparação da expressão de GFRA1 com e sem tratamento FSH in vitro	129
Gráfico 4 - Comparação da expressão de GFRA1 com e sem tratamento FSH in vitro	130
Gráfico 5 - Expressão gênica do GFRA1 em diferentes tempos de cultivo após o tratamento com FSH	131
Gráfico 6 - Massa Testicular (g) dos camundongos tratados com Busulfan e controle	143
Gráfico 7 - Massa Testicular (g) dos camundongos tratados com Busulfan e controle	143
Gráfico 8 - Diâmetro Tubular (mm) entre os camundongos tratados com Busulfan e o controle	144
Gráfico 9 - Túbulos seminíferos positivo para DAZL após 4-6 semanas de tratamento com Busulfan	149
Gráfico 10 - Túbulos seminíferos positivo para PLZF após 6 semanas de tratamento com Busulfan	149
Gráfico 11 - Túbulos seminíferos positivo para PLZF após 6 semanas de tratamento com Busulfan	150
Gráfico 12 - Túbulos seminíferos positivo para PLZF após 4- 6 semanas de tratamento com Busulfan	150
Gráfico 13 - Taxa de viabilidade (%) de espermatozoides aspirados do epidídimo após 4 e 6 semanas de tratamento com Busulfan	152

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência de Primer de cães (<i>Canis Lupus Familiares</i>) para análise de qPCR.....	64
Quadro 2 - Sequência de Primers de Cães (<i>Canis Lupus Familiares</i>) para análise de PCR.....	127
Quadro 3 - Número de animais e células transplantadas por testículo de camundongos receptores.....	161
Quadro 4 - Tipo celular e quantidade de células germinativas caninas transplantadas nos camundongos receptores	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média e Desvio padrão do peso (gramas) dos testículos caninos	85
Tabela 2 -	Viabilidade das células antes e após o enriquecimento com gradiente descontínuo de percoll (27-35%)	89
Tabela 3 -	Experimento demonstrando adição de fatores de crescimento em relação ao tempo de cultivo, avaliando o número de células ($\times 10^4$)	91
Tabela 4 -	Ranking para avaliação da espermatogênese em camundongos tratados e não tratados com Busulfan.....	139
Tabela 5 -	Massa testicular (g), camundongos tratado com Busulfan e não tratados	143
Tabela 6 -	Diâmetro testicular (μm) dos camundongos tratados com Busulfan e não tratados	144
Tabela 7 -	Contagem de espermatozoides por ml no epidídimo após tratamento Busulfan	151
Tabela 8 -	Taxa de viabilidade (%) de espermatozoides aspirados do epidídimo após tratamento com Busulfan.....	151

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS (EGCS) CANINAS	25
2.2	DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS IN VITRO	26
2.3	CULTIVO DE CÉLULAS GERMINATIVAS ADULTAS.....	29
2.4	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS ADULTAS	31
2.5	ESPERMATOGÊNESE	33
2.6	XENOTRANSPLANTE	37
2.7	FATORES QUE INFLUENCIAM O XENOTRANSPLANTE.....	38
2.7.1	Fatores Hormonais.....	39
2.7.2	Busulfan	42
2.7.3	Técnica de Injeção Celular.....	44
2.8	IMUNO PRIVILÉGIO DOS TESTÍCULOS.....	45
3	JUSTIFICATIVA	49
4	HIPÓTESE	51
5	OBJETIVO GERAL.....	52
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
6	FLUXOGRAMA	55
6.1	EXPERIMENTO 1- DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS (EGCS) CANINAS	58
6.1.1	Delineamento Experimental.....	58
6.1.2	Material e Métodos	59
6.1.2.1	Diferenciação de células germinativas embrionárias caninas	59
6.1.2.2	Diferenciação de células germinativas embrionárias caninas com adição de ácido retinóico.....	60
6.1.2.3	Expressão gênica- Caninas (EGCs) diferenciadas com All-trans retinóico in vitro	60
6.1.2.3.1	<i>Extração de RNA e síntese de cDNA</i>	<i>61</i>
6.1.2.3.2	<i>Reação Polimerase em cadeia em Tempo Real (qPCR).....</i>	<i>61</i>
6.1.2.3.2	<i>Desenho do primer e validação</i>	<i>62</i>
6.1.2.4	Citometria de fluxo	64
6.1.3	Resultado	65
6.1.3.1	Diferenciação espontânea	65
6.1.3.2	Expressão de marcadores moleculares nas células embrionárias pré diferenciadas por diferenciação espontânea.....	66
6.1.3.3	Diferenciação por ácido retinóico	67
6.1.3.4.1	<i>Alterações morfológicas das células embrionárias caninas derivadas de corpos embriões induzidas com ácido retinóico (ATRA)</i>	<i>67</i>
6.1.3.4.2	<i>Expressão gênica após o tratamento das egcs caninas pré-diferenciadas com all-trans ac retinóico (ATRA)</i>	<i>68</i>
6.1.3.4.3	<i>Expressão de marcadores moleculares nas células embrionárias pré diferenciadas</i>	<i>71</i>
6.1.4	Discussão e Conclusão	72

6.2	EXPERIMENTO 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO ESPERMATOGONIAIS (SSCS)	77
6.2.1	Delineamento Experimental	77
6.2.2	Material e Métodos	78
6.2.2.1	Coleta de material para extração e cultura de células germinativas	78
6.2.2.2	Cultivo das espermatogoniais caninas	78
6.2.2.3	Purificação e Enriquecimento do cultivo das células tronco espermatogoniais adultas (SSCs).....	80
6.2.2.3.1	<i>Gradiente Descontínuo de Percoll</i>	80
6.2.2.3.2	<i>Plaquetamento diferencial</i>	81
6.2.2.4	Caracterização fenotípica das células germinativas adultas caninas	82
6.2.2.4.1	<i>Protocolo de Citometria de fluxo</i>	82
6.2.2.4.2	<i>Imunofluorescência</i>	83
6.2.2.4.3	<i>Imunohistoquímica</i>	83
6.2.3	Resultados	84
6.2.3.1	Análise morfologia do Testículo Canino	84
6.2.3.2	Cultivo Celular e Fatores de Crescimento	86
6.2.3.3	Isolamento e enriquecimento das células tronco espermatogoniais <i>in vitro</i>	88
6.2.3.4	Formação de colônia	92
6.2.3.4.1	<i>Morfologia das células tronco espermatogoniais in vitro</i>	92
6.2.3.4.2	<i>Imunofenotipagem- Identificação das espermatogônias</i>	94
6.2.4	Discussão e Conclusão	99
6.3	EXPERIMENTO 3 - COMPARAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DAS CÉLULAS TRONCO ESPERMATOGONIAIS DE CÃES PRÉ-PÚBERES E ADULTOS	106
6.3.1	Delineamento Experimental	106
6.3.2	Material e Métodos	107
6.3.2.1	Coleta das Amostras	107
6.3.2.2	Análise Imunohistoquímica	107
6.3.2.3	Cultivo Celular.....	108
6.3.2.4	Análise Imunocitoquímica	109
6.3.2.5	Análise de Citometria de Fluxo	109
6.3.3	Resultados	110
6.3.3.1	Imunolocalização de Células Germinativas Caninas <i>in vivo</i>	110
6.3.3.2	Análise fenotípica das células germinativas <i>in vitro</i>	114
6.3.4	Discussão e Conclusão	118
6.4	EXPERIMENTO 4 - Análise da adição de FSH <i>in vitro</i> nas SSCs caninas.....	125
6.4.1	Delineamento Experimental	125
6.4.2	Material e Métodos	126
6.4.2.1	Coleta das Amostras	126
6.4.2.2	Imunofluorescência.....	126
6.4.2.3	Expressão gênica das células tratadas e não tratadas com FSH <i>in vitro</i>	127
6.4.3	Resultados	128
6.4.4	Discussão e Conclusão	131
6.5	EXPERIMENTO 5 - Teste agente quimioterápico-Busulfan em camundongos C57BL/6.....	136
6.5.1	Delineamento Experimental	136
6.5.2	Material e Método	137
6.5.2.1	Ensaio funcional do tempo de ação do Busulfan na espermatogênese em camundongos C57BL/6.....	137

6.5.2.2	Avaliação Macro e Microscópica da Espermatogênese.....	138
6.5.2.3	Análise Morfométrica dos Testículos	138
6.5.2.4	Imunohistoquímica	139
6.5.2.5	Avaliação dos Parâmetros Espermáticos	140
6.5.2.6	Análise Estatística	140
6.5.3	Resultado	141
6.5.3.1	Análise Histológica - Ensaio Dose/Efeito dos Camundongos Tratados com Busulfan	141
6.5.3.2	Análise morfológica das Mudanças nos Testículos dos Camundongos Tratados com Busulfan	142
6.5.3.3	Imunohistoquímica	147
6.5.3.4	Parâmetros Espermáticos	151
6.5.4	Discussão e Conclusão	153
6.6	EXPERIMENTO 6 - Xenotransplante.....	158
6.6.1	Delineamento Experimental.....	158
6.6.2	Xenotransplante - Experimento 1.....	159
6.6.2	Material e Métodos	159
6.6.2.1	Obtenção das células transgênicas	159
6.6.2.2	Análise da expressão do gene exógeno LacZ e eGFP nas células tronco germinativa canina transduzidas	160
6.6.2.3	Transplante SSCs caninas transfectadas	160
6.6.2.4	Análise do animal receptor após o transplante.....	162
6.6.3	Resultados	163
6.6.4	Xenotransplante-Experimento 2 e 3.....	167
6.6.4.1	Material e Métodos	167
6.6.4.1.1	<i>Transdução e análise da expressão do gene exógeno eGFP nas células tronco germinativa canina</i>	<i>167</i>
6.6.4.1.2	<i>Análise do perfil fenotípico das células transplantadas nos camundongos receptores.....</i>	<i>168</i>
6.6.4.1.3	<i>Transplante SSCs caninas transfectadas</i>	<i>168</i>
6.6.4.1.4	<i>Análise do animal receptor após o transplante</i>	<i>169</i>
6.6.4.1.5	<i>Análise de PCR para DNA α-satelite canino</i>	<i>170</i>
6.6.4.2	Resultados – Experimento 2	171
6.6.4.2.1	<i>Análise do perfil fenotípico das células transplantadas nos camundongos receptores.....</i>	<i>171</i>
6.6.4.2.2	<i>Análise do Animal Receptor após o Xenotransplante.....</i>	<i>172</i>
6.6.4.3	Resultado – Experimento 3	173
6.6.4.3.1	<i>Análise do perfil fenotípico das células transplantadas nos camundongos receptores.....</i>	<i>174</i>
6.6.4.3.2	<i>Análise do animal receptor após o Xenotransplante</i>	<i>174</i>
6.6.4.3.3	<i>Análise de PCR para DNA α-satelite Canino</i>	<i>176</i>
6.6.5	Discussão e Conclusão	177
7	CONCLUSÃO GERAL.....	183
	REFERÊNCIAS	187

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Uma célula é considerada célula tronco quando apresenta a capacidade de autorenovar e produzir células que podem se diferenciar em um ou mais tecidos. As células tronco embrionárias são células pluripotentes, com a capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares, e estas são tipicamente derivadas da massa celular interna do blastocisto, entretanto no testículo adulto existem as células tronco espermatogoniais (SSCs) unipotentes, responsáveis por manter a espermatogênese nos animais adultos (TRAVIS; KIM; MEYERS-WALLEN; 2009).

As tecnologias reprodutivas com células tronco vêm sendo discutidas. Travis; Kim e Meyers-wallen (2009) mencionam que estas tecnologias são benéficas para os carnívoros, uma vez que o desenvolvimento de linhagem de células tronco embrionárias de cães e gatos podem ser essenciais para a geração de animais transgênicos e auxiliar nos avanços de pesquisas em doenças veterinárias e humanas.

A partir de estudos com células tronco murinas muitos outros foram desenvolvidos, como, por exemplo, linhagens derivadas de primatas não humanos: com macaco *rhesus* (THOMSON; KALISHMAN, 1995.) sagui comum (THOMSON; KALISHMAN, 1996), macaco *cynomolgus* (SUEMORI et al., 2001), e alguns estudos foram realizados com cães (DOBRINSKI et al., 1999; KIM et al., 2007; LEE et al., 2014).

Os estudos com cães na área de células tronco ainda são bem escassos, uma vez que os ensaios com células tronco espermatogoniais foram iniciados por Dobrinski et al. (1999), os quais mencionam em sua pesquisa a importância destes animais como modelo experimental. Entretanto, cães e gatos são considerados importantes modelos biomédicos nos estudos de transplantes, além de apresentarem várias doenças homologas aos humanos, incluindo várias formas de tumores, cegueira (ACLAND et al., 2005; LINGAAS et al., 2003), defeitos ortopédicos (ATHANASIOU et al., 1995), doenças como a distrofia muscular e os distúrbios hemorrágicos (TSAI et al., 2007), por esta razão, são importantes modelos para os estudos científico e clínico em ambas medicinas, veterinária e humana.

O transplante de células tronco espermatogoniais e xenoenxerto, oferece uma nova proposta para propagar o material genético de machos importantes para pesquisa ou na conservação das espécies selvagens. Este tipo de transplante de células tronco vem sendo utilizado como forma de fornecer uma nova estratégia de tratamento para a infertilidade e no

entendimento da biologia da espermatogênese (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; BRINSTER, 2002).

Honaramooz et al. (2002) e Shinohara; Inoue E Ogonuki (2002) descreveram a produção bem-sucedida de espermatozoides funcionais de diferentes espécies de mamíferos em enxertos de testículos colocados em camundongos imunodeficientes (NCr nu/nu), estes promoveram o aumento do interesse na técnica, principalmente por ser um tratamento contra infertilidade.

Contudo, os avanços nos estudos com células tronco germinativas têm sido na habilidade de isolar, cultivar e manter como uma linhagem de células multipotentes. E, habilidade de criopreservar e transplantar as SSCs tem proporcionado uma possibilidade para terapias clínicas (TRAVIS; KIM; MEYERS-WALLEN; 2009).

Dobrinsski et al. (2014), mencionam que 23 espécies de mamíferos sendo: 3 primatas, 2 roedores, 1 lagomorfo e 4 carnívoros, pertencentes a 15 famílias classificadas em 6 ordens foram utilizados como doadores de tecido testicular no xenoenxerto, e 16 das 23 espécies obtiveram a completa espermatogênese, ou seja, as células germinativas mantiveram-se no ciclo celular mostrando a aplicabilidade desta técnica.

O sucesso do xenotransplante com a produção bem-sucedida de espermatozoides, pode promover a geração de animais transgênicos (SCHLATT; KIM; GOSDEN, 2002; SHINOHARA; INOUE; OGONUKI, 2002) e a preservação da genética de animais essenciais para pesquisa. Contudo, poderemos desenvolver a transgenia canina, proporcionando novas oportunidades para a verificação e indentificação de genes que são realmente causadores de fenótipos e o desenvolvimento de terapias para tratamento de doenças caninas.

Desta forma, as perspectivas e os desafios que precisam ser conquistados na área reprodutiva devem ser discutidos, bem como a manipulação *in vitro* das SSCs. No qual, apresentam inúmeros avanços nas pesquisas nesta área tornando-se importantes na evolução da tecnologia reprodutiva dos mamíferos domésticos. Portanto, este estudo tem como proposta trazer subsídios imprescindíveis para a viabilização de pesquisas que destaquem a espermatogênese e o desenvolvimento da implementação do xenotransplante como um modelo acessível *in vivo*.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS (EGCS) CANINAS

Lawson et al. (1999); Ying et al. (2000); Ying e Zhao (2001), cerca de 6,25 dias pós coitum (dpc) em camundongos, a proteína morfogenética óssea (BMP) designa uma região de sinalização do que epiblasto que promove a formação de células germinativas primordiais (PGCs). Nestas células a supressão da expressão de genes das células somáticas, promovem a expressão de genes pluripotentes como OCT3/4, Nanog e Sox2 (AVILION et al., 2003; CHAMBERS et al., 2007). Após uma extensa reprogramação, as PGCs voltam a re-expressar Stella (SAITOU; BARTON; SURANI, 2002).

Um pequeno grupo de PGCs rapidamente prolifera e iniciam a migração de um a dois dias por meio da linha primitiva, junto a endoderme intestino primitivo alongando, para eventualmente colonizar a crista genital (gônadas primordiais) (GINSBURG; SNOW; MCLAREN, 1990; MOLYNEAUX et al., 2001). Após a entrada na crista genital, os PGCs adotam uma morfologia arredondada e após a reprogramação epigenética, estas se tornam suscetíveis a diferenciação do tecido somático.

De acordo com Martins et al. (2011) em embriões caninos de 21 e 25 de gestação, não é possível identificar o sexo do feto, entretanto, é possível identificar as PGCs específicas. Segundo o autor supracitado há presença de duas populações distintas de PGCs, uma população de células com característica morfológica de gonócitos e outra população que muitas vezes aparece em pares e apresentam um maior volume citoplasmático.

Em muitas espécies as células germinativas passam por duas fases no desenvolvimento embrionário, a primeira fase ocorre no início da embriogênese, quando a formação das células germinativas primordiais (PGCs) e estas células migram para a crista genital, o qual apresenta componentes somáticos para a maturação gonadal. Na segunda fase as células germinativas iniciam a divisão celular por meio da meiose e diferenciação para oogenese e espermatogênese (WYLIE, 1986).

Muitos estudos concordam que as PGCs surgem do epiblasto proximal, no início do desenvolvimento do embrião, elas em camundongos migram do mesentério dorsal e iniciam o desenvolvimento na crista genital. Nos machos, quando as PGCs chegam à crista genital, são

inclusas pelas células de Sertoli, e tornam-se gonócitos (MCLAREN, 2000; ZHAO; GARBERS, 2002).

Entretanto, vem se discutindo muito sobre PGCs e EGCs, em ratos as PGCs migram e proliferam e estão presentes na crista genital, estas são células pluripotentes encontradas pré e pós-migração. Entretanto, quando são isolados no momento da migração passam a ser denominadas célula germinativa embrionária (EGC), para distinguir sua origem, embora nos ratos essas células sejam bem semelhantes à linhagem de células tronco embrionárias (ES), que são derivadas da massa celular interna (ICM) (TAM; SNOW, 1981; MATSUI; ZSEBO; HOGAN, 1992; SHAMBLOT et al., 1998; DURCOVA-HILLS; AINSCOUGH; MCLAREN, 2001; DONOVAN; MIGUEL, 2003).

Assim, como mencionando anteriormente, não se sabe qual a demoninação correta para essas células, uma vez que os autores acabam adotando terminologias específicas. Portanto, vários estudos concordam que as PGCs são as células germinativas iniciais, elas estão presentes no embrião antes de iniciar espermatogênese (ANDERSON et al., 2000; LACHAM-KAPLAN, 2004). As PGCs em camundongos aparecem ao mesmo tempo em que as três camadas embrionárias e iniciam a migração na linha primitiva para o alantóide, e em seguida para o endoderma embrionário adjacente (ANDERSON et al., 2000).

Desta forma, durante o desenvolvimento do testículo embrionário, os gonócitos migram para a periferia dos cordões seminíferos e se transformam em espermatogônias localizadas sobre a membrana basal (BELLVE et al., 1977). Os termos "espermatogônias" englobam tanto as células indiferenciadas, quanto as células tronco espermatogoniais (ES), que são uma população diferenciada que entra em meiose e produz espermatozoides. Uma vez que estas células estão presentes desde a fase neonatal até a idade adulta, podem ser coletadas tanto de machos imaturos bem como em adultos (BELLVE et al., 1977).

2.2 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS IN VITRO

Células tronco primordiais (PGCs) e células tronco germinativas espermatogoniais (GSCs) são utilizadas em estudos de xenotransplante para restauração da fertilidade (NAYERNIA et al., 2004). Desta forma, os cientistas usam as células tronco embrionárias como ponto de partida para a diferenciação em células germinativas.

Para a produção das células tronco germinativas espermatogoniais (GSCs) *in vitro* é necessário manter a viabilidade por um longo período, assim os pesquisadores desenvolveram métodos para enriquecer a população destas células (NAGANO, 2003).

Estudos demonstram que células tronco embrionárias são capazes de se diferenciar espontaneamente em células germinativas (HUBNER et al., 2003) ou serem induzidas a se diferenciar pela adição de fatores de crescimento (NAYERNIA et al., 2006) ou por meio da imitação do ambiente embrionário com a formação de corpos embrióides (TOYOOKA et al., 2003; GEIJSEN et al., 2004).

A diferenciação das PGCs em GSCs resulta na mudança de alguns marcadores, incluindo a diminuição de fosfatase-alcálica, CD117 e SSEA-1, e as GSCs passam a expressar beta 1 integrina, Cd49F e o CD117 em espermatogônias diferenciadas (SANDLOW et al. 1999). As PGCs estão envolvidas na ação sinérgica das proteínas BMPs que controlam a formação destas células. Expressão de Fragilis também aparece na fase da migração destas células, induzindo a expressão de outros genes específicos como STELLA e VASA, estes são mantidos até a fase de células germinativas pós-meióticas, induzindo as células somáticas na crista genital (TOYOOKA et al. 2000; SATO et al., 2002). Por fim, o DAZL é exclusivamente expresso nas células germinativas por um longo período, mas é requerido no desenvolvimento das PGCs e para a maturação e diferenciação das GSCs (YEN 2004; ZWAKA; THOMSON, 2005).

Estas células segundo Hubner et al. (2003) podem ser obtidas *in vitro* quando cultivadas com monocamadas, formação de corpos embrióides e sem células alimentadoras ou LIF, que permite a espontânea diferenciação. Nayernia et al. (2006) também utilizaram uma monocamada para obtenção de células germinativas, neste estudo gametas haplóides de machos foram diferenciados a partir de ESCs após indução com ácido retinóico.

Segundo Clark et al. (2004) as células tronco embrionárias humanas diferenciam *in vitro*, após 21 dias de cultivo, assim estas células expressam marcadores de células germinativas maduras, sendo um exemplo a expressão do marcador VASA. Outro estudo com camundongos mostrou que as células derivadas da massa celular interna do blastocisto e epiblasto são capazes de se diferenciar em células germinativas machos e fêmeas *in vitro* (HUBNER et al., 2003; TOYOOKA et al., 2003). A diferenciação de oócitos por células embrionárias em camundongo foi obtida por diferenciação espontânea de cultura de células aderentes, indicada pela análise de marcadores específicos de células germinativas (VASA; GDF9 e SCP3) (HUBNER et al., 2003).

Vários processos têm sido desenvolvidos para a derivação de células germinativas do macho por meio das células embrionárias, entretanto Cai et al. (2013) descrevem a diferenciação de células tronco embrionárias e células tronco pluripotentes de camundongos em células germinativas, após a derivação de corpos embriões com 7 dias, suplementação de ácido retinóico (RA) e monocamada fibroblástica. O ácido retinóico, segundo o relatado por Trautman et al. (2008) e Pellegrini et al. (2008), estimula as células embrionárias a proliferar e iniciar a meiose por meio da sinalização de CYP26/Stra8.

O ácido retinóico (RA), ativa genes específicos germinativos rapidamente. As células tratadas com este fator, têm um nível elevado de expressão dos genes Stra8, Dazl e Mvh, que são marcadores de células germinativas, com até 24 horas após adição do ácido retinóico. O Dazl (*azoospermia-like*) um fator intrínseco responsável por responder adequadamente aos sinais das células somáticas relacionados aos fatores extrínsecos que influenciam as células germinativas a dividir meioticamente e a proliferar (FENG et al., 2014).

As vias de sinalização importantes para a diferenciação das células germinativas como: RA e FGF estão relacionadas no processo de migração para a crista genital das PGCs. Estas células são capazes de suprimir suas respostas a estes fatores antes de terem concluído sua migração, assim o DAZL pode desempenhar um papel na resposta das células germinativas permitindo estimular o ambiente somático para as PGCs entrarem na crista genital e serem reprogramadas (FENG et al., 2014).

Stra8 emergiu como o *gatekeeper* para entrada em células germinativas em meiose (ANDERSON et al., 2008) sendo sensível a RA (ácido retinóico) e necessária para a meiose. No testículo pós-natal, RA é importante para induzir as células germinativas a entrar em meiose por meio do aumento da regulação de Stra8. Estudos sugerem que a expressão induzida pelo RA de Stra8 é provavelmente conservada nas células germinativas do ovário fetal, garantindo a sua entrada em meiose, ao passo que no testículo fetal, a sinalização é RA atenuado por uma combinação de degradação ativa de RA / CYP26B1 e ação antagonista de FGF9. Além disso, em ambos os sexos, a entrada em meiose é realizada por meio de mecanismos que envolvem reguladores intrínsecos, como NANOS2 no sexo masculino, MSX1 / MSX2 no sexo feminino e DAZL, PRC1 e DMRT1 em ambos os sexos (FENG et al., 2014).

Geijsen et al. (2004) realizaram experimento com a suplementação do meio com 2uM de ácido retinóico, e demonstraram que os corpos embriões cultivados sobre camada embrionária de camundongos (MEF) por sete dias, tinham uma porcentagem significativa de

células positivas para SSEA1, diferentemente das células embrionárias tratadas apenas com ácido retinóico, que extinguiram a expressão de SSEA1.

O RA é transduzido por meio de duas famílias de receptores de ácido retinóico, os receptores nucleares (RARs) e receptor nuclear retinóico X (RXR), os dímeros do RXR, ligam os elementos de resposta do ácido retinóico (RAREs) e estes controlam a expressão de genes-resposta de ácido retinóico (MARK; GHYSELINCK; CHAMBON, 2006). Entretanto, pesquisas mostram que *Dazl* e *Mvh* não tem RAREs (embora o promotor de *Stra8* contenha dois RAREs). Contudo, é possível que lentamente o ácido retinóico, seja regulado pela expressão do *Stra8* por meio da ligação dos dímeros RAR-RXR e esses com RAREs (KOUBOVA et al., 2006).

Segundo Soprano; Teets e Soprano (2007) os metabólitos do RA são all-trans ácido retinóico (atRA) e 9cis-RA. O atRA é utilizado na diferenciação de células tronco, dependendo da concentração adicionada ao meio, este pode influenciar a diferenciação para um tipo específico de células. Por exemplo, 10^{-7} - 10^{-8} M atRA induz a diferenciação em neurogêneses, 10^{-9} M cardíaca e muscular e 10^{-6} M em células germinativas (OKADA et al., 2004; SILVA et al., 2009; LIN et al., 2010). Entretanto, as células quando tratadas com atRA exibem alterações no nível de expressão dos genes associados à diferenciação das células tronco, e estas mudanças, de acordo com pesquisas, podem ser divididas em três fases: resposta primária (0-16 h após o início do tratamento) início da diferenciação (16 h-2 dias) e a diferenciação total (5-6 dias) (MICALLEF et al., 2005; SALERO; HATTEN, 2007).

2.3 CULTIVO DE CÉLULAS GERMINATIVAS ADULTAS

Pesquisas sobre a espermatogênese *in vitro* têm sido contínuas. Assim, a manipulação de células germinativas oferece a oportunidade de se estudar os mecanismos da linhagem germinativa e desenvolver novas técnicas terapêuticas com estas células. Assim, várias tentativas têm sido feitas para estabelecer culturas destas células, tal qual a utilização de meios de cultura específicos, fatores de crescimento, soros, meio condicionado de origem testicular ou não testicular (HULEIHEL; ABUELHIJA; LUNENFELD 2007; CREEMERS et al., 2002)

Desta forma, em 1970, Steinberger e Steinberger usaram testículos de camundongos imaturos, em um sistema de cultura de órgãos por meio da indução de gonócitos a diferenciar-

se em espermátocitos (paquíteno). Um dos aspectos importantes do seu método de cultura foi a colocação de fragmentos de tecido testicular sobre a superfície do meio de modo a permitir a fácil troca de oxigênio, e o pleno acesso aos nutrientes do meio. Entretanto, os autores supracitados não observaram a conclusão da meiose ou a produção de espermátides nos seus estudos.

Nagano et al. (1999) afirmam que as células germinativas não podem ser mantidas durante um longo período de tempo em cultura, e para estas células são necessários vários fatores de crescimento como: GDNF, fator inibitório leucemia (LIF), fator de crescimento epidérmico (EGF), e *fator de crescimento de fibroblasto básico* (bFGF). Estes fatores foram utilizados com êxito em cultura de células tronco germinativa de camundongos por períodos variáveis (KANATSU-SHINOHARA et al., 2003; NAGANO et al., 2003).

Recentemente, o desenvolvimento da plasticidade da cultura de células germinativas foi destaque por relatar que as células pluripotentes podem ser isoladas, a partir das culturas de células de testículos neonatais ou adultos de ratos (KANATSU-SHINOHARA et al., 2003) e pela demonstração de que os materiais genéticos das células tronco adultas de machos podem promover a fertilização de óocitos viáveis quando transplantadas em uma gônada indiferenciada (OKUTSU et al., 2006).

Izadyar et al. (2002) identificaram espermatogônias tipo A isolando e enriquecendo o cultivo de SSCs bovinas usando plaqueamento diferencial. Posteriormente, Izadyar et al. (2003) e Oatley et al. (2004), cultivaram SSCs bovinas na presença de uma camada alimentador com células de Sertoli e fibroblastos embrionários bovinos (BEF), respectivamente. Entretanto, na ausência de fatores de crescimentos, muitas colônias cultivadas sobre Sertoli deram origem a espermatogônias diferenciadas, as quais expressavam o receptor C-kit.

O longo tempo de cultivo foi estabelecido por Izadyar et al. (2003) e Apontes et al. (2006) juntamente com fatores de crescimento. Em adição, vários métodos têm sido realizados para o enriquecimento das SSCs, incluindo a deficiência de vitamina A (VAN PLET et al., 1996); seleção das células por Sorting (MACS), gradiente centrifugação, plaqueamento diferencial (HERRID et al., 2009).

Assim, muitos estudos demonstram a importância do microambiente ou nicho que promove os fatores de proliferação e diferenciação da população de célula tronco (KIGER et al., 2000). Entretanto, pouco se sabe sobre estes fatores no processo de autorrenovação das espermatogônias tronco em mamíferos e como eles influenciam no comportamento das células. Alguns estudos relatam que a autorrenovação pode estar relacionada à interação das

células tronco e células somáticas, constituindo o nicho (SPRADLING; DRUMMOND-BARBOSA, 2001). Em vivo, sabe-se que a interação das espermatogônias indiferenciadas com as células de Sertoli, promove este nicho (CHIARINI-GARCIA; RAYMER; RUSSELL, 2003).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS ADULTAS

A espermatogênese é um processo altamente regulado, no qual células germinativas indiferenciadas são classificadas como células tronco espermatogoniais (SSCs) (DE ROOIJ, 2001). Em roedores as espermatogônias (As) são consideradas as células tronco da espermatogênese, por serem capazes de manter a espermatogênese por autorrenovação, diferenciação e produção contínua de espermatozóide (OAKBERG, 1971; De ROOIJ, 2001).

As células tronco espermatogoniais compreendem apenas 0,03% de todas as células germinativas do testículo e são definidas como células tronco por terem as capacidades mencionadas anteriormente (TEGELENBOSCH; De ROOIJ, 1993). Segundo Tegelenbosh e De Rooij (1993) e Huckins (1971) as SSCs são células raras, sendo 1 em 3000-4000 células por testículo de camundongo adulto, 1 em 500 células em ratos e 1 em 5000 células em humanos. Portanto, o estabelecimento de uma população pura ou significativamente enriquecida de SSCs é essencial para o primeiro passo antes da aplicação.

Estas células são as únicas no corpo adulto a dividirem mitoticamente e contribuir com genes para as gerações seguintes, tornando-os um perfeito alvo para a manipulação genética (DOBRINSKI, 2006).

Sabe-se que as células tronco nos testículos se encontram na membrana basal e têm sua morfologia já definida, entretanto marcadores de superfície de antígenos específicos têm sido identificados (RUSSELL; REN; SINHO-HIKIN, 1990; DE KRETZER; KERR, 1994). Particularmente, marcadores específicos SSCs são úteis para identificar, e isolar estas células, além de ajudar na purificação. Sendo possível aplicar esta técnica em diferentes biotecnologias com o objetivo de usar a técnica de transplante das células germinativas (HONARAMOOZ, 2010).

Existem três proteínas de SSCs que estão envolvidas na regulação da autorrenovação e manutenção destas células. Um destes fatores de transcrição é PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger) e outros encontrados membranas destas células, os quais são receptores

de membrana GFR α 1 (Família do receptor alfa 1), C-kit ou CD117 (tyrosine-protein kinase Kit), THY-1 (Cluster of Differentiation 90) e o CD49f (Integrina alfa 6) (TREANOR et al., 1996; BUAAS et al., 2004; HOFMANN; BRAYDICH-STOLLE.; DYM., 2005; OATLEY et al., 2009; OATLEY; BRINSTER, 2012).

As células germinativas além de VASA expressam proteínas específicas que nenhum outro tipo de célula expressa, tais como DAZL, VASA, SCP3, GDF9 ou TEK1. Estudos estabeleceram que SSCs expressam α -6 e β 1-integrina, GFR α 1, CD9, THY-1, e EpCAM. Oatley e Brinster (2008) demonstraram que estas proteínas de superfície apresentam importantes funções nas células tronco espermatogoniais. Por exemplo, β integrinas desempenham funções importantes na migração das células para o nicho germinativo após o transplante (KANATSU-SHINOHARA et al., 2008).

GFR α 1 é um receptor componente do GDNF mediante ao sinal de transdução. Nas células germinativas em camundongos adultos e jovens, esta proteína é expressa em uma pequena população de espermatogônias indiferenciadas (espermatogônias tipo A), sendo que mudanças nos níveis destas proteínas podem influenciar o destino das espermatogônias. De acordo com estudos, devido ao baixo número e proliferação destas células, espermatogônias GFR α 1 positivas são raras e quase nunca são localizadas próximas de outra espermatogônia GFR α 1 positiva, com similar morfologia (CAIRES; BROADY; MCLEAN, 2010).

Zheng et al. (2014) em uma revisão de literatura sobre células tronco espermatogoniais em animais domésticos, mencionam que as espermatogônias indiferenciadas com potencial SSCs apresentam algumas características fenotípicas de células tronco embrionárias, sendo assim alguns marcadores embrionários com SSEA-1 marcam subconjuntos de espermatogoniais em animais pré-púberes (KIM et al., 2013).

O C-kit é um receptor da família Tirosina kinase, que se liga ao fator de célula tronco (SCF-*stem cell factor*) produzido pela célula de Sertoli. Este, receptor de fator de células tronco (SCF), é expresso em espermatogônias Aal e A1-A4 e em espermatogônias tipo B, mas não em espermatogônias As e Apr (SCHRANS-STASSEN et al. 1999). Ele estimula a diferenciação do ciclo celular mitótico e reduz significativamente a apoptose destas células (YAN et al., 2000; DOLCI et al., 2001). Por esta razão, aplicações de C-kit para o isolamento de espermatogônias resultam numa seleção de espermatogônias diferenciadas e não células tronco espermatogoniais (SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER, 2000).

Em alguns estudos como os realizados por Izadyar et al. (2002) e Koruji et al. (2009) as espermatogônias de camundongo eram negativas para C-kit, sendo positivo apenas para algumas espermatogônias A1-A4, Aal e tipo B. Heidari et al. (2012) confirmaram a marcação

deste em testículo de cabra, mas com diferentes graus de intensidade em diferentes populações de células germinativas, mas espermatogônias tipo A tinham maior imunorreatividade, embora houvesse uma pequena população negativa.

Em contraste, o integrina alfa 6 ou CD49f em camundongos resulta em uma população enriquecida de SSCs. Esta proteína de superfície é comumente encontrada em espermatogônias localizadas na membrana basal do túbulo seminífero (GOLESTANEH et al., 2009), este marcador segundo Maki et al. (2009) foi expresso em células intersticiais de primatas. A expressão de CD49f na superfície de SSCs, foi relatado em primatas pelo autor supracitado e em outras espécies, incluindo roedores (SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER, 1999) e sagui (HUSEN et al., 1999), indicando que este marcador é conservado entre as espécies.

Segundo Martin e Seandel (2013), vários estudos demonstraram que marcadores de superfície foram identificados e expressos ou não em espermatogônias de camundongos (KUBOTA et al., 2003; KANATSU-SHINOARA et al., 2004; BUAGEAW et al., 2005; HOFMANN et al., 2005; TOKUDA et al., 2007). Marcadores positivos incluem THY-1 (THY-1), CD9, GFR α 1 e CDH1 enquanto CD117, integrina alfa 6 e CD45 foram negativos. No entanto, Izadyar et al. (2011) e He (2010) mostraram que as espermatogônias humanas expressam Integrina alfa 6 (CD49f), THY-1 (CD90) GFRA1 e PLZF. Além disso, o THY-1 juntamente com o GFRA1 foi utilizado para purificar a população de SSCs humanas.

2.5 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo cíclico que ocorre nos túbulos seminíferos dos mamíferos adultos e pode durar de 30 a 78 dias (HESS; FRANÇA, 2007). Nos cães a duração do processo espermatogênico é de aproximadamente 60 dias e nos camundongos em média 35 dias, sendo este o tempo necessário para uma espermatogônia ser liberada no túbulo seminífero e formar espermatozoides (SOARES et al., 2009).

Este processo ocorre de forma regular onde há divisão celular e diferenciação, pelo qual as células próximas à membrana basal, chamadas de espermatogônia-tronco sofrem gradativamente mudanças morfológicas, funcionais e bioquímicas. Durante o desenvolvimento embrionário, células germinativas primordiais (PGCs) se deslocam da região do saco vitelínico do embrião para as gônadas indiferenciadas (Crista genital). Martins

et al. (2011) descreve que embriões caninos de 21 a 25 dias de gestação apresentam duas populações de PGCs distintas, a primeira com células com morfologia de gonócitos, ou seja núcleo arredondado, nucléolos proeminentes e a segunda com células que aparecem em pares e com grande volume citoplasmático. Estas duas populações irão se formar após diversas mitoses. Entretanto, segundo Pieri et al. (2015) o período partir do 35º dia de gestação no cão, ocorre a formação da genitália externa, com a diferenciação sexual.

Em machos caninos, os gonócitos diferenciam-se no período que antecede a puberdade para formar o tipo específico de espermatogônias (A0) (HAFEZ, 2003). Durante essa fase, as espermatogônias sofrem mitose, e com isso, algumas das células formadas permanecem inativas, as quais são denominadas células tronco germinativas, normalmente estocadas para reabastecimento de espermatogênese (REECE, 2006).

A puberdade dos cães é caracterizada pelo aparecimento dos primeiros espermatozoides nas vias genitais e, de acordo com Mialot et al. (1988), ocorre no primeiro ano de vida. Na espécie canina, o processo de espermatogênese inicia-se aos 4 meses de idade, no entanto apenas entre o período de 10-12 meses de idade é possível se verificar espermatozoides no ejaculado canino (MIALOT, 1988; SANTANA, 2012). Paula; Cardoso (1995) citam que maturidade sexual nos cães é o período em que o rendimento espermatogênico atinge níveis máximos, em geral dos três aos seis anos de idade. Embora, não se tenha bem definido, nesta espécie, a idade reprodutiva. Abrishami, Abbasi e Honaramooz (2010) em um experimento de xenoenxerto avaliaram cães em diferentes idades e estes os denominam como imaturos; jovens e adulto (<4, 4 a 6, e >6 meses). Harkey et al., (2013) e Kim et al., (2007) utilizaram cães pré-púberes (3 a 5 meses de idade) em seu experimento de isolamento de espermatogônias e transplante.

Estas modificações altamente complexas e organizadas ocorrem em três fases: a proliferativa (espermatogonial); caracterizada pela proliferação de espermatogônias e, simultaneamente, algumas células resultantes tornam-se espermatócitos primários e outras se mantêm para garantir o processo de renovação; fase meiótica (espermatócitos) envolve os espermatócitos primários e secundários que, através do processo de divisão reducional ou meiótica originam as espermátides e a última fase denominada de espermiogênese (COURROT et al., 1970), seguindo para a diferenciação em células haplóides altamente especializadas denominadas espermatozoides (CASTRO; BERNEDSON; CARDOSO, 1997).

A espermatogênese é um processo, no qual se produz e perdem-se continuamente células diferenciadas. Este processo assemelha-se a autorrenovação de outros tecidos adultos, que apresentam a função de reposição das células quando ocorre uma lesão, entretanto na

espermatogênese as células que promovem esta reposição são as células tronco espermatozoniais (Spermatogonial stem cells-SSCs) (OATLEY; BRINSTER, 2008).

Portanto, os diferentes tipos de espermatogônias, presentes nos testículos de todas as espécies de mamíferos, apresentam diferentes funções. Um ciclo regular mantém a população de espermatogônias, que se diferenciam em células germinativas para manterem a continuidade da espermatogênese e preservar o material genético (BACHA, 2003).

Como este é um processo contínuo, as espermatogônias estão sempre prontas para se dividir e formar os espermatócitos. As espermatogônias são células pequenas, imaturas que sofrem expansão clonal por meio de muitas mitoses, formando 5 gerações celulares (A1, A2, A3, B1 e B3), nesta fase parte do seu citoplasma permanece unido formando as pontes intercelulares que permite comunicação entre estas (RUSSEL et al., 1990; NEVES, 2001).

Em um estudo de revisão realizado por Oatley e Brinster (2012), em roedores a população de espermatogônias indiferenciadas é separada em *Asingle* or *As* (espermatogônias individuais), *Apai*red ou *Apr* (2 células) e *Aaligned* or *Aal* (4,8 e 16 células). Em primatas esta população pode ser de dois tipos: os referentes às *Adark* ou *Ad* e *Apale* ou *Ap*. A espermatogênese só inicia quando a diferenciação das SSCs resulta na produção das células-filhas (*Apr*) que estão empenhadas em promover o desenvolvimento em espermatozoides, ao invés de autorrenovação (HUCKINS, 1971; OAKBERG, 1971; DE ROOIJ; RUSSELL, 2000) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema comparativo do processo de autorrenovação e proliferação da população de espermatogonial de mamíferos e cães

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016)

Legenda: Auto renovação e proliferação da população de espermatogonial de mamíferos e cães. **(A)** representando a espermatogênese dos mamíferos em geral, mostrando os diferentes subtipos de espermatogônias. A célula tronco espermatogônias (SSC ou como ou Asingle) são capazes de se auto-renovar (seta curva) ou se diferenciar em espermatogônias Apaired ligadas por uma ponte intercelular (seta reta). As espermatogônias Apaired posteriormente proliferam em 4, 8 e 16 espermatogônias (Aaligned), em a ultima fase ocorre a produção de espermatogônias diferenciadas. A espermatogônias diferenciação do tipo A proliferam e se diferenciam em espermatogônias tipo B. **(B)** nos cães as espermatogônias tipo A são as células tronco (SSCs) que auto-renovam e proliferam, resultando na mitose e diferenciação em espermatogônias intermediária e posteriormente em tipo B que são as espermatogônias diferenciadas (Baseado nos dados descritos por SOARES et al., 2009; HOFMANN, 2008).

Em cães, a literatura ainda não tem bem definidos quantos tipos de espermatogônias existem e quais realmente são SSCs, segundo Soares et al. (2009), nos cães o ciclo do túbulo seminífero é de 8 estágios, sendo definidos pela morfologia das espermátides, diâmetro tubular e cabeça do acrosso, entretanto as espermatogônias tipo A, seguem até o estágio 8 do primeiro ciclo, e posteriormente são diferenciadas em intermediárias e em seguida tipo B ainda no primeiro ciclo (Figura 1).

A penúltima fase se caracteriza por duplicar e trocar o material genético, e seguidamente, estas divisões meióticas dão origem às espermátides arredondadas e haplóides. Na espermiogênese, as espermátides arredondadas sofrem a compactação da cromatina,

formando o flagelo, acrossomo e perda de citoplasma, podendo ser liberada para o lúmen do túbulo seminífero como espermatozóide (KERR et al., 2006).

2.6 XENOTRANSPLANTE

Durante os últimos 100 anos estudos do mecanismo de regulação da espermatogênese tem progredido, principalmente em relação ao transplante de células tronco germinativas (BRINSTER, 2002). Esta técnica vem sendo utilizada para distinguir defeitos causados pela função intrínseca das espermatogônias tronco e do ambiente extrínseco e restaurar a fertilidade, além de poder ser útil no tratamento clínico, produção de animais transgênicos de importância econômica (OGAWA et al., 2000).

Em 1994, a técnica de transplante de espermatogônia foi descrita, na qual as células germinativas de um camundongo fértil puderam ser transplantadas para o túbulo seminífero de um camundongo infértil e desenvolver a espermatogênese completa das células do doador (OGAWA et al., 2000; BRINSTER, 2002). A partir deste estudo muitos outros foram realizados, com vários modelos de animais de subconjuntos diferentes. Ogawa et al. (1999) provaram por meio do transplante de espermatogônias provenientes dos testículos de diferentes espécies, a capacidade de colonizar os testículos do camundongo receptor. Os autores relatam que quando as células do testículo de hamster são transplantadas para os testículos camundongo, estas células geram colônias de células germinativas e espermatozoides do doador (CLOUTHIER et al., 1996).

Dobrinski et al. (1999) realizaram o xenotransplante de cães de 1-5 anos, em camundongos imunodeficientes, e segundo o autor as células do cão encontravam-se em pares ou em cadeias curtas no túbulo seminífero do receptor após o transplante das células frescas ou criopreservadas. Kim et al. (2008) e Harkey et al. (2013) realizaram o transplante de SSCs de cão-cão, por meio da irradiação do animal receptor. Entretanto Kim et al. (2008) mencionaram o sucesso apenas de um animal no transplante, segundo o autor havia espermatozoides maduros no lúmen do epidídimo, constatando a espermatogênese completa do doador.

Diferentemente Harkey et al. (2013) isolaram, cultivaram, manipularam geneticamente e transplantaram as SSCs caninas em cães com 5 meses de idade, os autores

citam que 14 meses pós-transplante, histologicamente os testículos apresentavam espermatogênese normal.

Outro estudo com felinos demonstrou a espermatogênese completa com a coleta de sêmen. O transplante de animais imaturos, também tem sido relatado em outras espécies, incluindo rato, coelho, hamster, porco, cabra e primatas (HONARAMOOZ et al., 2005; SCHLATT; KIM; GOSDEN, 2002). Assim, a técnica de transplante xenogênico, segundo estes autores, promove a espermatogênese natural mantendo o microambiente do doador intacto, permitindo a acessibilidade para o estudo e manipulação da função testicular e recuperação do sêmen para ser utilizado em reprodução assistida.

Kim et al. (2008) e Brinster et al. (2003) citam que o sucesso para o transplante entre as espécies requer vários passos, entre eles a distância filogenética relacionados com o doador e a completa depleção das células germinativa do receptor. Assim, alguns animais por apresentarem uma distância filogenética muito grande, não permitem a restauração da espermatogênese (DOBRINSKI et al., 1999).

De acordo com Mota et al. (2011) as pesquisas realizadas com xenotransplante até o momento, somente os tecidos testiculares de animais imaturos dão origem a espermatozoides e a taxa de sucesso do xenotransplante de animais pré-púberos ou adultos é mínima ou inexistente em várias espécies testadas, e estes degeneram após 50 semanas após o transplante conforme demonstrado em gatos (KIM et al., 2008) e cães (ABRISHAMI; ABBASI; HONARAMOOZ, 2010).

2.7 FATORES QUE INFLUENCIAM O XENOTRANSPLANTE

O xenotransplante das células tronco espermatogoniais (SSCs) tem sido utilizado como uma proposta para a propagação do material genético dos machos (TRAVIS; KIM; MEYERS-WALLEN; 2009). Segundo estes autores o transplante de SSCs pode ser aplicado na conservação de espécies de carnívoros, bem como na pesquisa médica.

Os fatores que contribuem para a natureza espermatogênica no xenotransplante são espécies-específicas e desconhecidos, podendo estar ligados: as células germinativas, uma vez que as células transplantadas não são unicamente SSCs, ao tecido somático, a idade do doador, ao sistema hormonal na interação entre o destinatário e o transplante, na diferença no tempo da espermatogênese entre as espécies, influencia do camundongo receptor, o método

de preservação do tecido antes do enxerto (TRAVIS e at., 2009; KIM et al., 2007; ARREGUI; DOBRINSKI, 2014), são fatores que podem influenciar o sucesso do xenotransplante.

Arregui; Dobrinski (2014) em um estudo de revisão discutem estes vários fatores, segundo os autores, nos últimos cinco anos houve um progresso significativo nestes estudos. No entanto, várias lacunas no conhecimento ainda permanecem, sendo necessários mais estudos para entender os determinantes do sucesso desta técnica.

2.7.1 Fatores Hormonais

Espermatogênese após a puberdade envolve quatro eventos distintos: autorrenovação das células tronco, que mantém a produção contínua de células germinativas durante toda a vida, proliferação e diferenciação das espermatogoniais que amplifica o número de células pré-meióticas, meiose em espermatócitos, e a espermiogênese, que é a diferenciação morfológica de espermátides arredondadas em espermatozoides. Estes eventos estão ligados a uma série de fatores, como o hormonal (ROSSI; DOLCI, 2013).

O FSH tem mostrado ter um papel crucial na espermatogênese, principalmente por ser capaz de ativar a proliferação das células de sertoli, influenciar a atividade mitótica das espermatogônias, e aumentar a diferenciação celular (DING et al., 2011). Este é necessário para o desenvolvimento e maturação das gônadas na puberdade e na produção de gametas durante a fase adulta (SIMONI; NIESCHLAG, 1995). O FSH é produzido e secretado pela glândula pituitária e atua por meio da ligação com receptores específicos, localizada exclusivamente nas gônadas, podendo se ligar as células de Sertoli e espermatogônias (ORTH; CHRISTENSEN 1977; PARVINEN et al., 1980)

As células de Sertoli são os alvos conhecidos do FSH nos túbulos seminíferos, as quais expressam receptores deste hormônio. Em ratos, tem sido demonstrado que o FSH desempenha um papel crítico na finalização do número de células de Sertoli durante o desenvolvimento neonatal, estes sinais não são apropriados para induzir a diferenciação da repopulação das espermatogônias nesta idade (MALKOV et al., 1998; FIX et al., 2004). Portanto, estas células fazem a mediação da ação hormonal sobre a espermatogênese, controlando o nicho das células tronco germinativas por meio da criação de um ambiente adequado para que ocorra o processo de diferenciação e proliferação (ROSSI; DOLCI, 2013).

As células de Sertoli controlam diretamente estes eventos por meio da comunicação intercelular de membrana e a produção de fatores de crescimento e citocinas que atuam diretamente no comportamento das células germinativas (ROSSI; DOLCI, 2013). Em macacos, quando o FSH foi administrado induziu a proliferação das células de Sertoli. Devido a estes fatores, o FSH vem sendo utilizado em vários estudos, para estimular a proliferação das espermatogônias, em um estudo com peixes e a administração do FSH em meio de cultivo, estimula a proliferação das células de sertoli e espermatogônias, pela via do GDNF-GFRA1 (BELLAÏCHE et al., 2014).

O GDNF é secretado pelas células de Sertoli após o nascimento, e é um fator parácrino encontrado no testículo responsável pela manutenção e autorrenovação das SSCs *in vivo* e *in vitro* (MENG et al., 2000; KUBOTA et al., 2004; HOFMANN; BRAYDICH-STOLLE; DYM, 2005). Kubota et al. (2004) mencionam que outros factores de crescimento secretados pelas células de Sertoli, tais como o factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF ou FGF2) e factor de crescimento epidérmico (EGF), são necessários para a proliferação das SSCs *in vitro*, embora parecem insuficientes para a autorrenovação *in vivo*. Em um experimento realizado por Tadokoro e colaboradores (2002) com camundongos SI / SL mutantes *in vivo*, cujos testículos produziam apenas espermatogônias indiferenciado tipo A, inibição do FSH por meio da injeção da gonadotropina antagonista (Nal-Glu), ocorreu diminuição da produção de GDNF, bem como da taxa de proliferação das espermatogônias indiferenciadas. *In vitro*, nas culturas primárias de células de Sertoli com adição de FSH, ocorre aumento na expressão de GDNF. Estes dados demonstraram que a FSH aumenta o nível de expressão de GDNF na célula de Sertoli (SIMON et al., 2007). Portanto, segundo os autores a produção por GDNF nas células de Sertoli e a autorrenovação das SSC são controladas localmente e sistemicamente pelo FSH (Figura 2).

Figura 2 - Regulação da expressão GDNF em células de Sertoli

Fonte: (HOFMANN, 2008).

Legenda: Regulação da expressão GDNF em células de Sertoli no testículo de camundongos. A expressão de GDNF pelas células de Sertoli está sob o controle de FSH, FGF2, TNF α e IL-1 β , provavelmente produzido pelas células intersticiais. Com este mecanismo o GDNF liga-se a proteína de membrana (GFR α 1/Ret) e controla o processo de autorrenovação das SSCs, que é controlado tanto sistemicamente e localmente.

As gonadotrofinas hipofisárias (LH, FSH) são glicoproteínas compostas por duas diferentes subunidades não-covalentes (alpha e beta) e duas similares entre os mamíferos (BOUSFIELD et al., 2006). Portanto, a similaridade entre as gonadotrofinas permite a interação entre os hormônios do camundongo receptor e o doador, mas as diferenças provocam a ineficácia da interação.

Em camundongos (isentos de LH ou T), o tratamento com FSH por 7 dias ou mais demonstrou que este induz significativamente a expansão das espermatogônias associadas com o aparecimento de células em meiose (Gc) (SINGH; HANDELSMAN, 1996; O'SHAUGHNESSY et al., 2010), confirmando que o FSH sozinho pode melhorar a diferenciação na repopulação de espermatogônias e iniciar a divisão meiótica, na primeira onda da espermatogênese. Embora, de acordo com os autores o FSH esteja restrito a proliferação das células de Sertoli na idade neonatal e este só irá regular a diferenciação das espermatogônias nas fases posteriores do desenvolvimento reprodutivo (O'SHAUGHNESSY et al., 2010).

Bhattacharya et al. (2012) concluíram que as células de Sertoli em ratos necessitam do FSH para induzir a diferenciação das espermatogônias, e este processo é dependente da idade do animal e é caracterizado pela regulação positiva da expressão de genes, como o SCF e

GDNF nas células de Sertoli, que são conhecidos por induzir o início da espermatogênese *in vivo*.

Quando da adição de FSH e de testosterona em cultura de células de Sertoli, tem sido relatado um aumento na secreção de fator mitogênicos (HOLMES et al., 1986). As tentativas de cultivo de espermatogônias têm sido inviáveis devido a problemas na purificação da população de células de testículo e a falta de conhecimento sobre a regulação da proliferação *in vitro* e diferenciação. Assim, *in vitro* os grupos de células suplementadas com FSH, não mostraram qualquer diferença significativa no número de colônias em comparação com o grupo controle. Hormônio folículo-estimulante parece estimular as células de Sertoli à proliferação e diferenciação durante o desenvolvimento fetal e início do desenvolvimento pós-natal tanto *in vivo* como *in vitro* (MEEHAN et al., 2000; ANJAMROOZ et al., 2006). Estimulo do FSH, nas células de Sertoli, promove a secreção de fatores de crescimento, os quais estimulam proliferação de espermatogônias tipo A (LAMB et al., 1991).

2.7.2 Busulfan

O sucesso de transplantes entre espécies esta na preparação do testículo receptor, portanto, uns dos métodos mais utilizados para eliminar as células germinativas endógenas, do testículo do animal receptor e criar espaço para as células tronco transplantam, é o tratamento com subletal dose do agente quimioterápico o Busulfan (BRINSTER et al., 2003).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para reduzir o numero de células germinativas no testículo, sendo irradiação (ZHANG et al., 2007), criptorquidismo (SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER; 2000), isquemia fria e tratamento hormonal (SCHLATT et al., 1999), além da esterilização com administração de fármacos (YOUNG et al., 1988; BRINSTER et al., 2003; DOBRINSKI et al., 1999).

O Busulfan [$\text{CH}_3\text{SO}_2\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{OSO}_2\text{CH}_3$] é um alquilante antineoplásico, bifuncional quimioterápico, classe de alquilsulfonatos e agente citostático. Sua designação química é 1,4-butanodiol dimetanossulfonato. Este tem sido utilizado como quimioterápico desde 1950, no tratamento na doença mieloproliferação e leucemia granulocita e mielocita crônica (GALTON, 1953; BUBNOFF; DUYSER, 2010). O Busulfan também é utilizado no tratamento de câncer, como imunossupressor após o transplante de órgão e no tratamento de doenças autoimunes (GEBHART; SCHWANITZ; HARTWICH, 1973).

Este quimioterápico tem efeito adverso e entre eles podem ser citados: a falha na espermatogênese, causado a infertilidade. Porque, este agente tem atividade citotóxica resultando na destruição das células hematopoiéticas e posteriormente azoospermia (MEISTRICH, 2009).

Bishop e Wasson (1986) realizam uma pesquisa de revisão sobre a toxicologia do Busulfan, neste mencionam varias citotoxicidade deste medicamento, assim alterações no sangue periférico de ratos tratados com 60mg/kg, tem como consequência as perdas de granulócitos, linfócitos e neutrófilos (FITCHEN; CLINE, 1980; JOSVASEN; BOYUM, 1973).

Em geral, este agente tem efeitos adversos sobre os componentes do sangue periférico, bem como ação citotóxica sobre as células tronco hematopoiéticas, todos os tipos de células progenitoras e nas populações de células tronco (DUN; EDSON, 1970; DUN, 1974).

De acordo com Halpern (1971) e Hartwich (1973), dependendo da dose administrada, o Busulfan tem efeito imunossupressor e pode limitar a reação inflamatória, devido à redução no número de leucócitos no sangue, prejudicar a função dos linfócitos, células B, polimorfos e células mononucleares que participam da resposta inflamatória.

Segundo Waites et al. (1973) administração intraperitoneal de Busulfan em camundongos, atinge seu nível máximo no sangue com 10 minutos aproximadamente, e a radioatividade pode ser detectada no fluido da rede testicular após 8 minutos e este aumenta nas 3 primeiras horas chegando a 20-25% em relação ao nível sanguíneo.

O efeito citotóxico do Busulfan ocorre por meio da formação de ligações cruzadas de DNA-DNA, DNA-proteína e rupturas dos filamentos individuais, entretanto este não interfere na síntese de DNA. Embora, exerça seus efeitos tóxicos sobre as células que estão na fase G1 no momento do tratamento. Estas células são mortas quando realizam mitose, enquanto aquelas que estão em fase S ou G2 são mortas na mitose subsequente (BUCCI; MEISTRICH, 1987).

Vários experimentos com ratos adultos mostram que o Busulfan causa efeitos adversos na fisiologia da reprodução, causando alterações no peso e tamanho das glândulas reprodutivas, nas células germinativas principalmente no processo de maturação, morfologia e produção celular (BISHOP; WASSON, 1986).

No testículo, Busulfan diferentemente de outros agentes quimioterápicos, destrói as espermatogônias diferenciadas, ou seja, preferencialmente mata células tronco espermatogoniais e causa o rompimento das junções entre as células de Sertoli, levando à

infertilidade do macho, e imigração das espermatogônias transplantadas para a lâmina basal (KRAMER; DE ROOIJ, 1968; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994).

Entretanto, a duração do efeito do quimioterápico no testículo depende da dose ministrada nos animais e esta segundo Bucci e Meistrich (1987), deve ter potencial para causar esterilização, ou seja, matar as células tronco espermatogoniais e células tronco, mas não causa sérios efeitos em outros órgãos. Desta forma, dependendo da dose ministrada, pode ocorrer regeneração espontânea da espermatogênese após tratamento com Busulfan, como uma medida funcional de SSCs.

2.7.3 Técnica de Injeção Celular

A implantação da tecnologia de transplante depende do preparo do receptor das células, do enriquecimento das espermatogoniais indiferenciadas e a escolha do melhor procedimento de transplante (KHAIRA et al., 2005). Vários estudos têm investigado as técnicas de transplante de SSCs nos túbulos seminíferos (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; OWAGA et al., 1997; OWAGA et al., 1999). Entretanto, estes estudos utilizam técnicas variadas para injetar as SSCs no local correto e tentam abranger um maior número de túbulos seminíferos, por esta razão alguns estudos desenvolveram a técnica de transplante por meio de injeção por pipetagem com micromanipuladores (OWAGA et al., 1997).

Entretanto, Owaga et al. (1997) descreve três técnicas para a injeção das células, por meio do micromanipulador, sendo por meio do ducto eferente, rede testes. No entanto, o tamanho e espaço do ducto eferente limita a quantidade de células transplantadas (OWAGA et al., 1999). Mas segundo o autor a injeção pela rede testes, requer menos dissecação, mas é necessária maior precisão no transplante.

Contudo, Ma et al. (2012) descreveu nova técnica de transplante de SSCs, no qual descreve a técnica modificada, em que se utiliza microscópio que permite a microinjeção manual nos túbulos seminíferos. O autor menciona que esta técnica permite a que as células sejam imediatamente transferidas para túbulos seminíferos e podem ser precisamente injetadas em vários túbulos e permite injetar até 50µl de suspensão celular em uma média de 10 minutos por testículo.

2.8 IMUNO PRIVILÉGIO DOS TESTÍCULOS

O testículo é considerado um órgão imune-privilegiado por fornecer um ambiente ideal para sobrevivência das células, xenoenxerto e por proteger as células germinativas da resposta auto-antigênicas, Head et al. (1983) citam que os locais imuno privilegiados como os testículos, são locais do corpo onde os antígenos estranhos são tolerados sem evocar respostas imunológicas inflamatórias prejudiciais, além da sobrevivência de tecidos estranhos enxertados pode ser prolongada.

A descoberta de que os testículos são um local imuno-privilegiado ocorreu há 40 anos quando, alguns estudos observavam que no transplante allogenico em ratos, este sobrevivia e era mantido por um longo período (HEAD et al., 1983). Para proteger as células germinativas e enxertos de tecidos estranhos do ataque do auto-imune, o testiculo tem um sistema o "privilégio imunológico", atribuído a existência da barreira hemato-testicular (BTB). Mas hoje sabe se que, além da barreira o privilégio imune é um processo ativo, gerenciado por fatores imuno-reguladores produzidos localmente que controlam a resposta imune (FORRESTER et al., 2008). Além de que o testículo representa um local imuno privilegiado distinto, onde ambos os alo-antigênicos e auto-antigênicos imunogênicos podem ser tolerados sem evocar respostas imunes prejudiciais (FIJAK; MEINHARDT, 2006).

A barreira hemato-testicular (BTB) está localizada no compartimento adluminal do túbulo seminífero e ela são formadas pelas células de Sertoli e junções adjacentes, composta por várias proteínas da membrana, que por sua vez contém vários componentes como moléculas de adesão, claudinas e ocludinas (FAWCETT; LEAK; HEIDGER, 1970). A BTB divide o epitélio seminífero em dois compartimentos, basal formado por espermatócitos jovens e espermatogônias e tem acesso das moléculas do compartimento intersticial e o adluminal é um microambiente totalmente isolado do sistema vascular, e é nele que a espermatogênese ocorre (espermátides, espermatozoides) (LUI; LEE; CHENG, 2001; WONG et al., 2004; SIU et al., 2003; KAUR; MITAL; DUFOUR, 2013) (Figura 3). A principal função da BTB é impedir os leucócitos e anticorpos de entrarem no túbulo seminífero, manter o ambiente para que a espermatogênese aconteça e separar as células germinativas do sistema imune do corpo (KAUR; MITAL; DUFOUR, 2013).

A imunotolerância nos testículos tem sido explicada pelo fato de que as células de Sertoli podem mecanicamente segregar todos autoantígenos das células germinativas por meio da barreira hemato-testicular (DYM; FAWCETT, 1970), entretanto algumas descobertas

recentes sugerem que a imunotolerância pode ser resultado de sinérgicos presentes em dois mecanismos, segregação de muitos autoantígenos e a produção local de moléculas imunossupressoras pelas células de Sertoli (DE CESARIS et al., 1992).

Segundo Kaur; Mital e Dufour (2013) em seu estudo de revisão, os papéis anatômicos, fisiológicos, imunológicos no testículo imuno privilegiado mostra que o ambiente tolerogênico dos testículos é resultado de vários fatores imunomoduladores expressos ou secretados pelas células testiculares como: células de Sertoli, células mióides peritubulares, células de Leydig e macrófagos, barreira hemato-testicular e fatores endócrinos e parácrinos.

Durante o desenvolvimento de um indivíduo o sistema imune, a capacidade de tolerar autoantígenos é adquirida, e isto acontece geralmente no período perinatal e na puberdade. Nestes períodos, uma grande quantidade de autoantígenos, que são reconhecidos como estranhos por moléculas do sistema imune são produzidas por meio do desenvolvimento das células germinativas. Estes autoantígenos podem induzir respostas auto-imunes quando são injectados em locais não-testiculares (TUNG et al., 1981).

Por esta razão, o transplante das células germinativas por xenoenxerto vem sendo realizado para o estudo no desenvolvimento das células germinativas, mas também para a produção de espécies comercialmente viáveis e ameaçadas de extinção (BRINSTER; AVARBOCK 1994; SILVA et al., 2012).

Figura 3 - Esquema da estrutura dos testículos de mamíferos

Fonte: (ZHAO et al., 2014).

Legenda: Esquemático da estrutura dos testículos de mamíferos. O testículo consiste em dois compartimentos: túbulo seminífero (ST). O ST é rodeado por células pertubulares miodes (MPC), a qual em conjunto com as células de Sertoli secretam substâncias para formar a lamina basal (BL) que encerra o epitélio seminífero. O epitélio seminífero é composto por diferentes estágios de desenvolvimento, as células germinativas, incluindo espermatogônias (SPG), espermátocitos primário (PSCs), espermátocitos secundários (SSC), espermátides arredondadas (RSS) e espermatozoides (EES), que estão rodeados por células de Sertoli colunar que se estendem a partir do BL para o lúmen dos túbulos seminíferos. A Barreira hemato-testicular (BTB) é formada por junções entre os vizinhos e as células de Sertoli perto da BL.

As células de Sertoli, também tem um papel fundamental para o testículo ser um local imune privilegiado, além de secretar a barreira hemato-testicular, ela tem propriedades imunossupressoras. Em estudos de transplante, as células de Sertoli fornecem uma proteção imune, resultando na sobrevivência do enxerto. Outro fator realizado por estas células e que ajuda neste privilégio é a atividade fagocítica das células Sertoli em relação às células germinativas em apoptose e residual, esta atividade é fundamental para a manutenção da homeostase testicular e regulação da imunidade e suporte de autotolerância (SANBERG et al., 1996; SUAREZ --PINZON et al., 2000; TANAKA et al., 2010).

As células germinativas ainda secretam algumas citocinas e o Fas ligante (FasL), FasL-induz apoptose e o Fas- linfócito que são mecanismos de supressão da resposta imune, entretanto os seus papéis ainda não são bem elucidados. De acordo com Zhao et al. (2014) em seu estudo de revisão, as células germinativas podem ser importantes na supressão da resposta imune e contribuir para o privilégio imune, mas o espaço intersticial é também um microambiente imunoprivilegiado.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

As pesquisas com células germinativas seja com PGCs (células germinativas primordiais) ou com células tronco espermatogoniais (SSCs), tem sido consolidadas com foco na biologia reprodutiva, principalmente como uma grande evolução na tecnologia da reprodução dos animais domésticos, assim, este estudo visa contribuir no entendimento da espermatogênese canina e no desenvolvimento das células germinativas *in vitro* e *in vivo*, por meio da caracterização, cultivo, isolamento e transplante das SSCs de cães. O xenotransplante vem sendo discutido como uma alternativa economicamente viável e prática na preservação das informações genéticas de doadores valiosos para a pesquisa, ou na conservação de espécies em extinção.

Portanto, o cão foi escolhido como modelo por apresentar várias características homologa ao humano e por ser um modelo que pode ser incorporado às situações clínicas. Alguns estudos de transplante e caracterização de SSCs caninas foram realizadas por Dobrinski et al. (1999), mencionaram que a distância filogenética entre o cão e o camundongo é um dos fatores que promove o insucesso do xenotransplante, Kim et al. (2008), demonstraram que SSCs enxertadas são capazes de reiniciar a espermatogênese no testículo do animal receptor da mesma espécie, Harkey et al. (2013) mostraram que as SSCs podem ter potencial de enxerto, após purificação, manipulação genética, cultivo, e criopreservação e Lee et al. (2014) realizaram algumas avaliações *in vitro* de SSCs caninas de animais pré-pubere. Portanto, neste estudo, as SSCs de cães foram caracterizadas, purificadas, mantidas *in vitro* e posteriormente foram transplantadas em camundongos imunodeficientes. Além, de promover a diferenciação *in vitro* de células germinativas embrionárias (EGCs) caninas em células com características fenotípicas de células germinativas adultas (SSCs).

HIPÓTESE E OBJETIVOS

4 HIPÓTESE

O restabelecimento da espermatogênese em animais inférteis é possível por meio do xenotransplante de células germinativas adultas ou células germinativas embrionárias (EGCs) pré-diferenciadas *in vitro*.

OBJETIVO GERAL

5 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa tem como objetivo a produção de espermatozoides caninos viáveis, geneticamente modificados, após a técnica de xenotransplante de espermatogônias em testículos de camundongos imunossuprimidos, a fim de analisar a eficiência de espermatogênese pós-transplante.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) diferenciar as células embrionárias caninas (EGCs) em células germinativas *in vitro*;
- b) transplantar as células tronco espermatogoniais derivadas de embriões ou animais adultos em camundongos imunodeficientes por meio do xenotransplante;
- c) avaliar macro e microscopicamente o tipo celular mais avançado no processo espermatogênico no camundongo receptor;
- e) avaliar a espermatogênese canina em camundongos receptores, utilizando técnicas de Imunohistoquímica e PCR.

FLUXOGRAMA

6 FLUXOGRAMA

Para melhor organização dos resultados e discussão optamos por descrever separadamente os experimentos realizados neste projeto de pesquisa, portanto segue abaixo 6 capítulos referentes a cada fase experimental (Figura 4):

- 6.1 Capítulo 1 (EXPERIMENTO 1) - DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONARIA (EGCS) caninas *in vitro*;**
- 6.2 Capítulo 2(Experimento 2) - Caracterização das células tronco espermatogonial (SSCs);**
- 6.3 Capítulo 3(Experimento 3) - COMPARAÇÃO IN VIVO E IN VITRO DAS CÉLULAS TRONCO ESPERMATOGONIAIS DE CÃES PRÉ-PÚBERES E ADULTOS;**
- 6.4 Capítulo 4 (Experimento 4) - Análise da adição de FSH *in vitro* das SSCs caninas;**
- 6.2 Capítulo 5 (Experimento 5) - Teste agente quimioterápico-Busulfan em camundongos C57BL/6;**
- 6.5 Capítulo 6 (Experimento 6) - Xentransplante das células tronco espermatogonial caninas em camundongos;**

Todas as fases estão de acordo com os princípios de experimentação animal segundo o protocolo nº 2549/2012 do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina e Zootecnia- Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Figura 4 - Delineamento experimental

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: Fluxograma experimental dos projetos realizados.

Capítulo 1- (Experimento 1)

Diferenciação das células germinativas embrionárias caninas

6.1 EXPERIMENTO 1- DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS EMBRIONÁRIAS (EGCS) CANINAS

6.1.1 Delineamento Experimental

Para diferenciar as células germinativas embrionárias caninas (EGCs) em células germinativas com características fenotípicas de células adultas e responder o primeiro objetivo deste trabalho, as células foram inicialmente coletadas de embriões de 22-27 dias de gestação e diferenciadas por meio de dois protocolos descritos por Ling e Neben (1997); Clark et al. (2004), ou seja, por meio da diferenciação espontânea e a adição de ácido retinóico (RA) *in vitro*. Para comprovar a diferenciação destas células foi avaliado a formação de corpos embrióides, a expressão de marcadores moleculares por meio da citometria de fluxo (GFRA1, C-kit, CD49f) e a expressão de genes ligados ao ácido retinóico (ATRA) no processo do desenvolvimento embrionário e pós-natal nas células germinativas *DAZL* e *STRA8* (Figura 5).

Figura 5 - Delineamento Experimental

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

6.1.2 Material e Métodos

6.1.2.1 Diferenciação de células germinativas embrionárias caninas

Nesta etapa realizamos a diferenciação das células germinativas embrionárias (EGCs) caninas em células da linhagem germinativa diferenciadas, utilizando células da crista genital de embriões de 22-27 dias de gestação (10 a 20mm) (PIERI et al., 2015), oriundos de campanhas de castrações realizadas na cidade de Pirassununga-São Paulo.

As células foram coletadas e cultivadas de acordo com o protocolo de Martins (2006) e Souza (2013) em meio de cultivo composto por 15% de DMEM (DMEM, Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com 2mM de glutamina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 100UL/ml penicilina; 10µg/ml estreptomicina (Sigma-

Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), aminoácidos não essenciais e nucleotídeos (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

6.1.2.2 Diferenciação de células germinativas embrionárias caninas com adição de ácido retinóico

Esta etapa visa a diferenciação das células germinativas baseada na geração de corpos embrióides (EBs) pelas células embrionárias caninas para indução a diferenciação na linhagem germinativa (LING; NEBEN, 1997).

As células foram cultivadas segundo o protocolo de Martins (2006) e Souza (2013), mantidas sobre uma camada de fibroblasto fetal canino, com 15% Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Cat#12430-112, Gibco™ Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA), suplementado com 2mM de glutamina (Cat#25030-081, invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 100UL/ml penicilina; 10µg/ml estreptomicina (Cat#15140-122, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), aminoácidos não essenciais, nucleotídeos (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), e 1000 U ml⁻¹ LIF (Cat#PHC9481, Invitrogen by life Technologies, Carlsbad, CA). As células foram incubadas por 7 dias em placas com 24 poços; após 5 dias de incubação e com a formação dos corpos embrióides, o meio foi suplementado com 2µM de all-trans ácido retinóico (Cat#R2615, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), o qual promove a diferenciação (GEIJSEN et al., 2004; CAI et al., 2013; BAHENA et al., 2013). As placas foram incubadas por 10 dias a 37°C com 5% CO₂.

6.1.2.3 Expressão gênica- Caninas (EGCs) diferenciadas com All-trans retinóico *in vitro*

Para verificar a expressão dos genes *STRA8* e *DAZL* nas células germinativas embrionárias após tratamento com 2µM de all-trans ácido retinóico (ATRA) (Cat#R2615, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), pelo período de 3, 5 e 10 dias, realizamos a reação de RT-PCR em tempo real. O RNA total das amostras de células (10⁴ células/amostras) foi extraído com Trizol® (Cat# 15596-018, Life Technologies, Carlsbad, CA) seguindo o protocolo descrito por Bressan et al. (2013).

6.1.2.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Nesta etapa descreveremos sucintamente a metodologia empregada. Utilizou-se 1 ml de Trizol®, para ressuspender cada amostra, que foram agitadas e mantida à temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, 200µl de clorofórmio foi adicionado a cada amostra, agitou-se manualmente durante 15 segundos, e centrifugou-se a 12000 ×g durante 15 minutos a 8°C. O sobrenadante foi recuperado, e 500µl de isopropanol foi adicionado e incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguidamente o conteúdo foi centrifugado a 12000 ×g durante 10 minutos a 8°C. Etanol a 75% foi adicionado ao pellet, centrifugado a 7500 ×g durante 5 minutos a 8°C e por fim , o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco ao ar durante 5 minutos.

Posteriormente o pellet foi novamente suspenso em 10-20 µl de água livre de RNase e o RNA foi quantificado numa espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA) com a finalidade de normalizar as reações de síntese de cDNA. Após a extração, o cDNA foi sintetizado com o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Cat#4368814, Life Technologies, Carlsbad, CA) seguindo as recomendações do fabricante (BREISSAN et al., 2013).

6.1.2.3.2 Reação Polimerase em cadeia em Tempo Real (qPCR)

As análises dos dados de expressão gênica por qPCR dos genes *STRA8* e *DAZL*, iniciou-se com o desenho dos primers e a padronização da concentração e eficiência do primer e da curva padrão das amostras, como descrito por França (2012) para endométrio bovino. Sendo assim, para garantir a confiabilidade dos resultados das reações, seguiu-se uma sistemática analítica (Figura 6), sendo que para as etapas de validação, utilizou-se uma amostra de cDNA contida por volumes iguais de cDNA das demais amostras.

Figura 6 - Esquema da validação do primer

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: Ilustração dos procedimentos adotados para validação do primer *STRA8* e *DAZL* de cão.

6.1.2.3.2 *Desenho do primer e validação*

Primeiramente foi desenhado os primers específicos para cada gene, sendo avaliados segundo os critérios de qualidade. Em seguida, realizou-se testes de concentração de primers e curva padrão da amostra para a reação de comparação entre os grupos. Por fim, para confirmar a amplificação específica da região delimitada pelo par de primers, o produto das reações de RT-PCR foi purificado e sequenciado.

Os primers foram desenhados com o auxílio do Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e foram avaliados com a interface Web oligoanalyser3.1 ([http://eu.idtdna.com/analyzer/Aplicativos / OligoAnalyzer /](http://eu.idtdna.com/analyzer/Aplicativos/OligoAnalyzer/)) para evitar a auto-regulação e formação de heterodímeros, homodímeros, bem como hairpin. Tais sequências foram testadas quanto a sua especificidade usando o software ‘Basic Local Alignment Search Tool’ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), no primer que apresentava resultados satisfatórios, realizamos o teste de concentração e curva padrão.

Para avaliação dos primers, as reações de qPCR com concentrações finais de cada reação de primers foi de 500nM, 250nM e 125nM, testamos em duplicata com uma amostra de cDNA pura. Em seguida, selecionamos a concentração de primers para a reação e comparação entre os grupos, onde comparamos a abundância dos transcritos entre as células tratadas com RA e as células controle, não foram tratadas.

Para a escolha da concentração de primers utilizou-se os parâmetros, eficiência da reação próxima a 100%, dentro do intervalo de 85 a 110%, curva de dissociação com pico único de amplificação para reações com cDNA e sem picos para reações controle, sem cDNA e a menor concentração limiar (Ct). Encontrada a melhor concentração para cada transcrito, realizou-se a curva padrão. Diluições seriadas do cDNA das amostras controle foram utilizadas em duplicata com a concentração do primer, previamente determinada no teste anterior. Para aceitação da curva, valores de inclinação da curva padrão (Slope), coeficiente de determinação (r^2) e eficiência, fornecidos pelo software do stepOnePlus foram avaliados. Adotamos curvas com eficiência entre 83 e 110% e r^2 próximo de 1 (FRANÇA, 2012).

Seguidamente, produtos do PCR foram purificados com o QIAquick® PCR Purification Kit (Cat#28104, Qiagen, Hilden, Alemanha) e quantificados por NanoVue (GE Life Science). As amostras foram diluídas e acrescidas das soluções dos respectivos primers e encaminhadas para o Centro de Estudo do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As sequências dos resultados foram acessadas pelo software Chomaz (<http://technelysium.com.au/>) e testadas quanto sua eficiência no software “ Basic Local Alignment Search Tool” <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> as análises de qPCR foram realizadas utilizando *StepOne™ Real time PCR* (Applied Biosystems-Calasbad, CA, EUA).

Em cada reação qPCR utilizou-se Poder SYBR Green® PCR Master Mix (Cat# 4367659, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) e 0,5 μ M de cada primer, com 15 μ l em duplicata utilizando para cada amostra (1 μ l de 250ng/ μ l cDNA equivalente no volume total por amostra). Instrumento StepOne Plus (Applied Biosystems Inc.) foi utilizado para conduzir qPCR em tempo real. Fase pré-ciclismo foi mantida a 95°C por 10 minutos, sendo 40 ciclos: desnaturação, aumento de temperatura e separação da fita dupla (95°C por 15 minutos), seguido do anelamento dos primers a região homologa no cDNA (60°C por 1 minuto) e a por fim a curva de dissociação 1, 2 e 3.

Como controle negativo da reação utilizou-se a mesma reação sem a adição da amostra de cDNA e como controle positivo, utilizamos testículo de cão. As razões da

expressão dos genes alvo (*STRA8* e *DAZL*) foram normalizadas pela razão da expressão do controle endógeno *18S*s.

O modelo empregado foi de quantificação relativa com correções pela eficiência do primer, e os dados subministrados pelo software do equipamento stepOne Plus (Step one software versão 2.3) foram analisados com o programa LinReg PCR (Versão 2015.0). Finalmente a expressão do gene *StRA8* e *DAZL* foi normalizada pela expressão do endógeno *18S*, empregando a metodologia de correção de eficiência da equação do Pfaffl.

Análise estatística dos períodos de 3 e 5 dias da adição do RA nas células embrionárias caninas (EGCs), foram avaliados comparando as células tratadas e controles, com o auxílio do Teste T não pareado (Man-Whitney teste), sendo 95% de confiabilidade ($p > 0,05$).

Quadro 1 - Sequência de Primer de cães (*Canis Lupus Familiares*) para análise de qPCR

Gene	ID Gene	Sequencia (5'- 3')	Tamanho (pb)	Concentração DNA (ug/ml)
<i>DAZI</i>	XM_534251.3	F: 5' ACTGGTGTGTCCAAAGGCTAT 3' R: 5' GGACGAGGCTGCACATGATA 3'	158	44
<i>STRA8</i>	XM_847727.2	F: 5' AAGATGCCTTCGATGTGGCA 3' R: 5' AATGGGGAGGTCTGGTTCCT3'	194	47
18S		F: 5' CCTGCGGCTTAATTTGACTG 3' R: 5' CTGTCAATCCTGTCCGTGTC 3'	187	55

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

6.1.2.4 Citometria de fluxo

Para a confirmação da diferenciação das células germinativas embrionárias utilizamos os marcados C-kit detectado em células germinativas primordiais, e em espermatogônias diferenciadas e tipo A (TOYOOKA et al., 2000), Alfa (6)-integrina, expresso em espermatogônias (FRÖJDMAN; PELLINIEMI, 1994) e GFRA1 é expresso em espermatogônias tipo A (SCHONFELDT et al., 2004; BUAGEAW et al., 2005; COSTA et al., 2012; WU et al., 2013).

O teste de imunofluorescência foi realizado nas células após 10 dias em cultivo com a adição de All- trans ac-retinóico (ATRA), com os marcados supracitados. As células caninas

foram centrifugadas e ressuspendidas em 300µl PBS com 1% de BSA (Cat#A2153, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), posteriormente incubadas por 1 hora com os anticorpos primários nas diluições: alpha 6 integrina anti-mouse (1:500, CD49f, Cat#ab20142, Abcam, Cambridge, UK), GFR apla 1 anti-rabbit (1:50, Cat#Sc10716, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) e CD90 (1:50, THY-1, Cat#Sc6071, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Para as amostras com C-kit anti-rabbit (1:100, CD117, Cat#ab5506, abcam, Cambridge, UK) foi necessário um bloqueio de 1 hora com BSA 5%. Posteriormente as células foram novamente centrifugadas com BSA 1% e incubadas com anticorpo secundário Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 conjugate (1:300; Catalog#A-11034, Invitrogen, Calsbad, CA, USA) e Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins (1:300; Catalog#F047902, Dako, USA) por 1 hora. Os controles negativos foram processados simultaneamente, omitindo-se o anticorpo primário.

A avaliação de imunofenotipagem foi realizada por meio do citômetro de fluxo BD-Excalibur (BD- Becton Dickinson, U.S.A) para leitura das células que expressavam as proteínas citadas acima, e os resultados foram analisados pelo *Software FCS Express 4 Flow research Edition*. Os dados estáticos foram analisados pelo método "least squares means" ANOVA usando o PROC GLM (General Mixed Models) do SAS (SAS for Windows, version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e o modelo matemático incluiu o efeito do tempo de cultivo 17 dias de cultivo.

6.1.3 Resultado

6.1.3.1 Diferenciação espontânea

Os resultados de diferenciação espontânea mostram que após 21 dias de cultivo as células não apresentavam nenhuma diferença morfológica, entretanto continuavam a formar aglomerados celulares, notou-se sugestiva morte celular (Figura 7A e B). Aos 30 dias de cultivo sobre camada de fibroblatos fetais (CEF), não houve a expressão do marcador molecular de célula germinativa, conforme dados da citometria, entretanto, estas não apresentaram nenhuma diferença morfológica visível ao microscópio (Figura 7 C e D).

Figura 7 - Fotomicrográfas do cultivo das células embrionárias caninas

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A) e (B) Células sem nenhuma diferenciação e formação de aglomerados celulares, após 21 dias de cultivo. Após 30 dias de cultivo (C) e (D), grande quantidade de células mortas. Barra: 100µm.

6.1.3.2 Expressão de marcadores moleculares nas células embrionárias pré diferenciadas por diferenciação espontânea

Para comprovar a diferenciação destas células, realizou-se a citometria de fluxo com marcadores expressos em espermatogônias indiferenciadas, SSCs que são as primeiras células a serem encontradas nos testículos. Os resultados de citometria foram elaborados após 30 dias de cultivo e revelaram que as células eram negativas para Integrina alfa 6 (CD49f) e CD117 (C-kit), demonstrando que estas células não se diferenciaram espontaneamente. Entretanto, o marcador CD90, revelou 72% de positividade após 30 dias de cultivo (Figura 8).

Figura 8 - Análise de Citometria de fluxo das células embrionárias após 30 dias de cultivo

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A) CD117 negativo. (B) CD49f baixa expressão com 0,22%. (C) CD90 alta taxa de positividade.

6.1.3.3 Diferenciação por ácido retinóico

6.1.3.4.1 Alterações morfológicas das células embrionárias caninas derivadas de corpos embrióides induzidas com ácido retinóico (ATRA)

As células embrionárias caninas foram retiradas da crista genital de embriões com 22-27 depois do coito (dpc). Após 5 dias em cultivo as células formaram aglomerados celulares, e a partir deste período iniciamos adição do ATRA (All trans ácido retinóico) por 10 dias, ao qual foi avaliado após este período por citometria de fluxo e expressão gênica.

Os resultados mostraram que no grupo tratado com ATRA por 2 dias, as células não mostravam alterações (Figura 9), mas com 5 dias de tratamento, elas tornaram-se mais maduras, pois apresentavam maior número de células agrupadas sugerindo uma alta proliferação celular, devido a capacidade de autorrenovação destas células. Aos 10 dias havia muitas células mortas no cultivo, não observamos mudanças do grupo tratado com ATRA para o controle com relação à morfologia.

Figura 9 - Cultura das células embrionária caninas com adição de ácido retinóico

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda; (A) Embrião canino com 22 dias de gestação. (B) 2 dias de tratamento com ATRA, (C) 5 dias pós adição de ATRA, evidenciando alta proliferação celular. (D) 10 dias, células em proliferação celular e células mortas (seta). Barra: 100µm.

6.1.3.4.2 Expressão gênica após o tratamento das egcs caninas pré-diferenciadas com *all-trans* ac retinóico (ATRA)

Para determinar se a indução da expressão dos genes *STRA8* e *DAZL* pela adição de ATRA é conservada em cães, investigamos os efeitos do tratamento do ácido retinóico nas células embrionárias germinativas (EGCs) do 22º ao 27º dia de gestação em cães. Através da

avaliação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real nossos resultados destacaram a detecção da expressão dos genes *STRA8* e *DAZL* em todas as amostras avaliadas.

O tratamento com ATRA por 3, 5 e 10 dias resultou no aumento da expressão *DAZL* nas células tratadas e não tratadas com ATRA, revelando que o *DAZL* é expresso nas células germinativas de embriões com 22-27 dias de gestação e, não sofrem influência no tratamento com ATRA (Gráfico 1). Quando comparamos estatisticamente as células embrionárias com e sem adição de ATRA após 3 e 5 dias *in vitro*, não há diferença estatística ($p>0,05$) (Figura 10).

Gráfico 1 - Expressão gênica do *DAZL* em diferentes tempos de cultivo

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: Avaliação da expressão do gene *DAZL* nas células germinativas embrionárias (EGCs), após a adição de ATRA *in vitro* (CRA) e sem adição de ATRA (SRA). Após os períodos de 3, 5 e 10 dias de cultivo com ATRA (3D; 5D e 10D).

Figura 10 - Expressão Gênica do *DAZL*

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: Avaliação da expressão do gene *DAZL* nas células germinativas embrionárias (EGCs) com 3 e 5 dias de cultivo, após a adição de ATRA *in vitro* (com RA) e sem adição de ATRA (semRA) ($p>0,05$).

As avaliações da expressão do gene *STRA8* nos três períodos revelou que no terceiro dia da adição de ATRA em cultivo as células germinativas embrionárias apresentavam maior expressão *STRA8* ao comparamos com as células não tratadas. No 5º dia de tratamento ocorre

uma diminuição da expressão de *STRA8* nas células tratadas e um aumento da expressão do gene nas células não tratadas (Gráfico 2), entretanto a comparação entre o 3 e 5 período não revelou diferença estatística ($p>0,05$) (Figura 11). Contudo, as EGCs tratadas a ATRA apresentaram maior expressão de *STRA8* no 10º dia.

Estes dados, sugerem que *STRA8* e o *DAZL* são expressos nas EGCs caninas no período de 22-27 dias de gestação, estes genes não apresentaram alteração na expressão com o tratamento de ATRA *in vitro*. Embora, gene *STRA8* apresente uma tendência aumentar a expressão no 5º dia de cultivo nestas células *in vitro*.

Gráfico 2 - Expressão Gênica do *STRA8* em diferentes tempos de cultivo

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: Avaliação da expressão do gene *STRA8* nas células germinativas embrionárias (EGCs), após a adição de ATRA *in vitro* (CRA) e sem adição de ATRA (SRA). Após os períodos de 3, 5 e 10 dias de cultivo com ATRA (3D; 5D e 10D).

Figura 11 - Expressão Gênica do *STRA8*

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: Avaliação da expressão do gene *STRA8* nas células germinativas embrionárias (EGCs), após a adição de ATRA *in vitro* (Com RA) e sem adição de ATRA (SemRA). Após os períodos de 3 e 5 dias em cultivo com ATRA ($p>0,05$).

6.1.3.4.3 Expressão de marcadores moleculares nas células embrionárias pré diferenciadas

Nossos resultados da análise fenotípica destacam que as células não tratadas com all-trans retinóico apresentaram-se negativas para CD49f; CD117e GFRA1 e no grupo tratado as células foram positivas para os três anticorpos, sendo a maior porcentagem de células positivas para GFRA1 e CD117. Na primeira análise imunofenotípica a porcentagem de células positivas foi menor do que na segunda avaliação, embora todas as análises foram feitas com a mesma quantidade eventos, e de células, sendo que estas diminuíram após o tratamento.

Na primeira análise 6,13% das células foram positivas para GFRA1, 7,5% (CD117) e 5,46% (CD49f), neste o embrião coletado apresentava em média 1cm de comprimento (Figura 12). Diferentemente, na segunda avaliação 52,18% (GFRA1), 20,25% (CD117) e 12,2% (CD49f) sendo o embrião de 1,9 cm, notamos também duas populações distintas de células, sendo uma com células pequenas, que sugere serem células mortas e outra que se diferencia destas populações (Figura 13).

Figura 12 - Análise da citometria de fluxo das células embrionárias, coletadas do embrião (1cm), após 10 dias de cultivo com e sem adição de all trans ácido retinóico

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A), (B) e (C) células cultivadas em meio de cultivo suplementado com All-trans retinoico, marcadas para CD117, CD49f e GFRA1. (D), (E) e (F) Células não tratadas com all-trans retinóico, marcadas para CD117, CD19f e GFRA1.

Figura 13 - Análise da citometria de fluxo das células embrionárias, coletadas do embrião (1,9 cm), após 10 dias de cultivo com e sem adição de all trans ácido retinóico

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A), (B) e (C) células cultivadas em meio de cultivo suplementado com All-trans retinóico, marcadas para CD117, CD49f e GFRA1. (D), (E) e (F) Células não tratadas com all-trans retinóico, marcadas para CD117, CD19f e GFRA1

6.1.4 Discussão e Conclusão

A estratégia para a derivação *in vitro* de gametas por meio das células tronco embrionárias de camundongos, está ligada ao uso de monocamada de cultura, formação de corpos embrióides e a adição de all-trans ácido retinóico (ATRA) ao meio de cultura. De acordo com os estudos realizados, estes podem estabelecer um melhor microambiente para as células embrionárias, promovendo a diferenciação em células germinativas (TOYOOKA et al., 2003; GEIJSEN et al., 2004; NAYERNIA et al., 2006), portanto foi realizado o cultivo das células embrionárias caninas, com alguns dos fatores citados, para que fosse promovido a diferenciação destas células *in vitro*

Clark et al. (2004) promovem a diferenciação espontânea de células embrionárias humanas em células germinativas, segundo os autores, estas células diferenciam em corpos embrióides e expressam VASA e marcadores de células germinativas pré-meióticas, diferentemente dos nossos achados no qual, as células não apresentaram imunomarcação, tendo apenas a marcação de CD90, mostrando o caráter tronco destas células.

Em machos e fêmeas a células germinativas, iniciam a meiose em diferentes períodos e o ATRA *in vivo* induz a meiose e a proliferação por meio do aumento da regulação da expressão CYP26/Stra8 (gene ácido retinóico), desta forma 2 μ M ATRA foi adicionado para a diferenciação na linhagem germinativa, conforme mencionado por Cai et al. (2013). Portanto, notamos que a adição de ATRA em células embrionárias caninas, promove a diferenciação e proliferação destas *in vitro*, conforme mencionado pelos autores acima

A técnica de RT-PCR mostrou a expressão de STRA8 e DAZL, nas células germinativas embrionárias (EGCs) caninas com e sem o tratamento com all-trans ácidos retinóico (ATRA) em diferentes períodos. De acordo com Child et al. (2011) mencionam que *in vivo* nas gônadas fetais humanas (8-9 semanas de gestação), a expressão de Stra8 é baixa ou ausente, em ambos os sexos, e permanece baixa nos machos por toda a gestação. Embora, os autores mencionam que com 17-20 semanas de gestação, ocorre um aumento significativo deste nos machos, e nas gônadas femininas com 14-16 semanas de gestação.

Child et al. (2011) descrevem que o padrão de desenvolvimento e sexo-específicos esta relacionado a expressão Stra8 que são conservados nas gônadas fetais humanos e em camundongos em estágios de desenvolvimento comparáveis, como relatados em outros estudos (HOUMARD et al., 2009; Le BOUFFANT et al., 2010), e em cães destacamos que o STRA8 também é conservado, uma vez que se nota a expressão nas EGCs de embriões com 22-27 dias de gestação.

Em cães a adição 2 μ M ATRA, mostrou uma alteração na expressão de STRA8, diferentemente do que ocorreu com a expressão de DAZL. Em estudos com células fetais humanas, tratadas com 1 μ M ATRA, durante 24 horas resultou em um aumento de Stra8 no testículo fetal. No entanto, este resultado sugere que o ácido retinoico pode induzir seletivamente a expressão de Stra8 (CHILD et al., 2011). Kasimanickam e Kasimanickam (2014), células germinativas de cães de em média 7.33 meses de idade, tratadas com 2 μ M all-trans RA, mostrou uma maior abundância de mRNA de STRA8 e DAZL *in vitro*. Segundo o autor, isto demonstra que administração do ácido retinóico *in vitro* é capaz de modular a espermatogênese canina. E que a expressão destes dois genes pode estar ligada ao fato de que o DAZL codifica uma proteína de ligação a RNA-específico de células germinativas, necessária para indução de Stra8 e início de meiose.

Células germinativas primordiais (PGCs) migram em direção a crista genital, proliferam e diferenciam-se em gonócitos, entre os dias 8,5 e 12,5 de gestação em rato (WYLIE et al., 1986; GIESE et al., 2012), estas células expressam marcadores específicos de células germinativas como DAZL na vida embrionária. Yen (2004) e Lacham-Kaplan (2004)

menção que o *DAZL* é expresso durante a maior parte da vida embrionária e adulta em camundongos. Este gene está presente no período de migração e pós-migração, e está envolvido na diferenciação e maturação das células germinativas. Em cães, observamos a expressão semelhante deste gene, em todos os períodos avaliados e nas células controles, sugerindo que as células germinativas embrionárias coletadas de embriões caninos de 22-27 dias de gestação (10-20mm) apresentam um perfil gênico de PGCs, em processo de migração ou pós-migração. Confirmando, achados descritos por Pieri et al. (2015) o qual menciona que neste período, ocorre o processo de formação da crista genital, e a chegada das PGCs nos embriões caninos avaliados por organogêneses e crown-rump.

Diferente do observado neste estudo com cão, no qual o *STRA8* foi encontrado em células germinativas com adição de ATRA e nas células controle, Koubova et al. (2006) descreveram um ensaio para determinar se exógeno RA pode induzir a expressão do gene *STRA8* nas gônadas cultivadas *in vitro*, e segundo os autores, os testículos dissecados de embriões de camundongos com 12.5 dias dpc cultivados durante 2 dias em meio controle sem RA não expressaram este gene, embora, testículos embrionários cultivados com RA exibido expressão abundante de *STRA8*. Estes achados, segundo o autor passa a ser uma questão sem resposta, uma vez que a expressão de *STRA8*, pode promover uma meiose precoce.

O RA é muito utilizado em cultivo de células germinativas para a diferenciação celular, pois promove a expressão de genes específicos germinativos. Nossos achados revelam que as células germinativas apresentam maior imunomarcagem dos genes CD117, CD49F e GFRA1 no grupo de células tratados com RA, conforme mencionado por Chen et al. (2012).

Geijsen et al. (2004) cultivou as células embrionárias de camundongos em uma monocamada de célula embrionária (MEF) e cultivou estas células por 7 dias na presença de 2µM ATRA, da mesma forma que neste experimento, entretanto nossas culturas foram mantidas por mais tempo por 10 dias. As células embrionárias caninas após 5 dias em cultivos com CEF, apresentavam uma alta proliferação celular, diferentemente dos encontrados por Cai et al. (2013) o qual, verifica a formação de corpos embrióides após 2 dias em cultivo induzidos pelo ácido retinoico, Clark et al. (2004) também citam a formação de corpos embrióides a partir das células embrionárias humanas diferenciadas espontaneamente, e são positivas para marcadores de células germinativas após 14 e 21 dias em cultivo.

As células embrionárias caninas diferenciaram segundo as análises de citometria de fluxo, após 10 dias em cultivo com adição de ATRA; de acordo com Guo et al. (2012) o processo de diferenciação das mESCs em células germinativas *in vitro* é mais acelerado do

que *in vivo*, assim em curto período de tempo observa-se a expressão de genes específicos de células germinativas quando os corpos embrióides são tratados com RA.

Guo et al. (2012) descreve que os corpos embrióides não apresentavam mudanças morfológicas quando tratados com ATRA, e que a diferenciação pode ocorrer em frações de células dentro corpos embrióides, mas não as em proliferação, demonstradas pelas mudanças na expressão dos genes, conforme encontrado nas células embrionárias caninas, as quais morfolologicamente não notamos mudanças, mas fenotipicamente houve a imunomarcagem de proteínas germinativas adultas.

Cai et al. (2013) utilizaram marcadores de pluripotência (Oct4) e de células germinativas (C-kit; MVH) para verificar a diferenciação das células embrionárias de camundongos, e segundo o autor por meio da imunofluorescência as células são positivas para estes marcadores, bem como relatado em nosso resultado como em células embrionárias caninas, o qual tivemos a marcação de CD117 após suplementação ATRA em cultura.

As células embrionárias caninas (ESC) tratadas com ATRA tiveram maior nível de expressão de CD117 e GFRA1, quando comparamos com as células não tratadas, como mencionado por Nayernia et al. (2006) o qual, caracterizou as células embrionárias diferenciadas em gametas e verificou a expressão de vários marcadores ligado ao início e final do estágio do desenvolvimento das células germinativas dos machos (Oct4, Stella e Mvh, Ddx4, C-kit), os autores destacam a maior expressão de C-kit (CD117) após o tratamento com ATRA, e sugere que estas células são capazes de diferenciar em espermatogônia.

Portanto, as células embrionárias caninas apresentam características *in vitro* semelhantes à literatura consultada, estas células imunofenotipicamente são positivas para marcadores de células germinativas adultas após o tratamento com ATRA, em um curto período de tempo. Entretanto, nosso estudo demonstrou que as células germinativas embrionárias caninas (EGCs) coletadas de embriões 22-27 dias de gestação expressam os genes *STRA8* e *DAZZL* *in vitro*. Estes resultados, sugerem que neste período, no embrião as células germinativas embrionárias, estão no período de migração e/ou pós-migratório para a crista genital, uma vez que há expressão de *DAZZL*. Outra possibilidade seria que as células germinativas embrionárias estão em processo de diferenciação para o início da meiose, devido a expressão do gene *STRA8*, embora, novos testes deveriam ser feitos, pois o gene *STRA8* está ligado ao processo de diferenciação sexual no embrião.

Capítulo 2- (Experimento 2)

Caracterização das células germinativas espermatogoniais (SSCs) caninas

6.2 EXPERIMENTO 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO ESPERMATOGONIAIS (SSCs)

6.2.1 Delineamento Experimental

Para compreender o comportamento e o nicho das células germinativas caninas *in vitro*, as células coletadas do testículo de cães pré-puberes (<3-6 meses), foram cultivadas e enriquecidas *in vitro*, pelas técnicas de gradiente descontinuo de percoll e plaqueamento diferencial. Para caracterizar as células utilizamos as técnicas imunohistoquímica, imunofluorescência e citometria de fluxo para obtenção de uma população de SSCs caninas, únicas células tronco encontradas nos testículos adultos e de extrema importantes para o sucesso do transplante de células germinativas e futuros estudos de infertilidade (Figura 14).

Figura 14 - Delineamento Experimental

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

6.2.2 Material e Métodos

6.2.2.1 Coleta de material para extração e cultura de células germinativas

As amostras de tecido testicular canino foram coletadas de campanhas de castração na cidade de Pirassununga-SP. Os testículos caninos foram acondicionados separadamente em tubos Falcon com solução de PBS (Solução Tampão fosfato-salino, Ph7.2), com solução de estreptomicina e penicilina (Cat#15140-122, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA). Posteriormente foram processadas em condições assépticas adequadas, de maneira que todo o procedimento ocorreu dentro de um fluxo laminar.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo-USP n° processo 2549/2012.

6.2.2.2 Cultivo das espermatogoniais caninas

Para este experimento coletamos amostras do tecido testicular de três cães pré-púberes (<3-6 meses). Após coletados os testículos lavados em solução de PBS com estreptomicina e penicilina (Cat#15140-122, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e a túnica albugínea foi removida com o auxílio de uma lâmina de bisturi n°24, seguidamente coletou-se um fragmento de aproximadamente 10 gramas do parênquima testicular (Figura 15A) e estes foram maceradas manualmente com auxílio de um êmbolo de seringa de 5 ml.

Para a digestão enzimática realizamos duas digestões, no qual os tecidos foram primeiramente transferidos para um tubo Falcon (50 ml) contendo collagenase tipo IA (0,5 mg/ml; Cat # 5138, Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA) na concentração de 1mg/ml por 60 minutos em estufa a 37°C, após este período as amostras foram centrifugadas por 8 minutos a 1500 rpm para a retirada do sobrenadante e o *pellet* ressuspensos em 2 ml de meio de cultivo modificado de acordo com Dobrinski et al. (1999), contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12) DEMEN F12 (Cat #BR-30004-05, LGC, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Cat#12657029, Gibco,

invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 6mM de L-Glutamine (Cat#25030-081, invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,5mM de Piruvato (11360-070, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), 10.000 U/ml de Penicilina e Espectromicina (Cat#15140-122, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 100 U/L de anfotericina B (Cat# A2942, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) (Figura 15B).

Posteriormente, as células foram passadas em peneira 70 μ m-e submetidas a gradiente descontinuo de percoll (Cat#P1644, Percoll®, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) a fim de eliminar as células somáticas Mióides e Sertoli (Figura 15C). As células foram cultivas por aproximadamente 16 horas em meio de cultivo modificado de acordo com Dobrinski et al. (1999) a 38°C em 5% de CO₂ durante 24 horas e posteriormente realizou-se o plaqueamento diferencial (LIU et al., 2011).

Figura 15 - Cultivo das células tronco espermatogoniais (SSCs) caninas

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A) Testículos caninos de 3 meses de idade; (B) Digestão enzimática realizada no tubo tipo Falcon com Colágenase tipo IA e (C) Filtragem das células após digestão enzimática em peneira (70 μ m filtro nylon).

6.2.2.3 Purificação e Enriquecimento do cultivo das células tronco espermatogoniais adultas (SSCs)

6.2.2.3.1 *Gradiente Descontínuo de Percoll*

Primeiramente, as células foram centrifugadas e resuspendidas em 2ml de meio de cultivo, coradas com azul de tripan e contadas para verificar a viabilidade celular. Para montagem do gradiente de percoll baseamos no protocolo segundo Liu et al. (2011) com modificações. Em resumo a solução de percoll foi preparada com 1% de percoll (P1644, Percoll®, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, US), 10% da solução tampão (90 g NaCl; 4,17 KCl; 3,02g NaHCO₃; 10,09 Glicose; 50ml de Hepes ácida 1M; 50ml de água destilada e 11,92g Hepes) pH 7,4 e utilizamos o gradiente de 11, 19, 27, 35 e 43 %.

Para montagem foram utilizados 2ml de cada concentração e adicionados em tubos falcon de 15ml, sempre da menor concentração para concentração mais alta; as células em suspensão recém-coletadas foram adicionadas lentamente na camada superior de percoll, seguido de centrifugação por 30 minutos em 800g a 20°C. As células que estavam na concentração de gradiente que variam entre 27% a 35% (Figura 16) foram coletadas, pois nesta fase segundo Liu et al. (2011) em humanos, encontra-se as SSCs. Posteriormente as células foram lavadas três vezes com PBS e ressuspendidas em meio de cultivo em placas de 60mm.

Figura 16 - Ilustração do gradiente descontinuo de percoll

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: Demonstrando o local de coleta das células entre as frações (27-35%).

6.2.2.3.2 *Plaqueamento diferencial*

As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por 24 horas, após este período as células em suspensão foram transferidas para uma nova placa de 24 poços com uma monocamada de fibroblastos fetais caninos (CEF) e mantidas em incubação por 12-18h. Esse procedimento é conhecido como plaqueamento diferencial, pois as células somáticas se aderem a primeira placa de cultivo, e as células germinativas ficam em suspensão.

Ao final do plaqueamento diferencial, em média $11,9 \times 10^5$ células foram contadas e 8×10^4 foram replaqueadas por poço. As células foram contadas pelo método de exclusão com azul de trypan e cultivadas em meio com LIF (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) e bFGF (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) na proporção de 1µl/ml em cada poço.

6.2.2.4 Caracterização fenotípica das células germinativas adultas caninas

6.2.2.4.1 *Protocolo de Citometria de fluxo*

Para a confirmação do enriquecimento das populações de células tronco espermatogoniais (SSCs) e caracterizar estas células, utilizamos os marcados: C-kit (CD117) detectado em células germinativas primordiais, e em espermatogônias diferenciadas e indiferenciadas (TOYOOKA et al., 2000; IZADYAR et al., 2002; KORUJI et al., 2009; HEIDARI et al., 2012), alfa 6 integrina (CD49f) expresso em espermatogônias indiferenciadas e células intersticiais (FRÖJDMAN; PELLINIEMI, 1994; GOLESTANEH et al., 2009; MAKI et al., 2009) e CD90 (THY-1) expresso em espermatogônias (LEE et al., 2006; HE et al., 2010).

Análise de citometria foi realizada com 8×10^4 células germinativas nos períodos de 0,5, 10, 15 e 30 dias em cultivo, com os marcados supracitados. As células caninas foram centrifugadas e ressuspendidas em 300µl PBS com 1% de BSA (Cat#A2153, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), posteriormente incubadas por 1 hora em anticorpos primários nas diluições: alpha 6 integrina anti-mouse (1:500, Cat#ab20142, abcam, Cambridge, UK) e THY-1 anti- goat (1:100, Cat#SC-6071, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA), GFR apla 1 anti- rabbit (1:50, Cat#Sc10716, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) e DAZL (1:100, ab34139, Abcam, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido). Para as amostras com C-kit anti-rabbit (1:100, ab5506, Cat# abcam, Cambridge, UK) foi necessário um bloqueio de 1 hora com BSA 5% e em seguida incubados com o anticorpo primário.

Seguidamente as células foram centrifugadas novamente com BSA 1% e incubadas com anticorpo secundario Rabbit anti-Goat IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 conjugate (1:300, Catalog#A-11078, Invitrogen, Calsbad, CA, USA), Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 conjugate (1:300; Catalog#A-11034, Invitrogen, Calsbad, CA, USA) e Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins(1:300; Catalog#F047902, Dako, USA) por 1 hora. Os controles negativos foram processados simultaneamente, com a omissão dos anticorpos primário.

A avaliação fenotípica foi realizada por meio do citômetro *FACS Aria Cell Sorter* com *DIVA software* V.6.1.2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). E os resultados foram analisados pelo *Software FCS Express 4 Flow research Edition* e os dados estáticos foram

processados pelo método "least squares means" ANOVA usando o PROC GLM (General Mixed Models) do SAS (SAS for Windows, version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). O modelo matemático incluiu o efeito do tempo de cultivo (0; 5; 10; 15 e 30 dias de cultivo).

6.2.2.4.2 *Imunofluorescência*

Utilizamos cortes congelados dos testículos, para a confirmação da avaliação por citometria de fluxo, com o anticorpo alpha 6 integrina (CD49f). Os cortes permaneceram 10 minutos em acetona (20°C) e posteriormente foram expostos a temperatura ambiente por 1 hora; as secções foram bloqueadas com solução de soro de cabra 10% por 1 hora, em seguida incubados com o anticorpo: anti-mouse alpha 6 integrina (1:100, Cat#ab20142, abcam, Cambridge, UK) por 24 horas (4°C). Após as lavagem subsequentes em soro de cabra com tris Hcl (1%), foram incubados com os anticorpos secundários fluorescentes Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins(1:300; Catalog#F047902, Dako, USA). Amplificada com Hoeschst (Trihydrochloride, Trihydrate, cat#33342, Invitrogen, Calsbad, CA, USA), lavados com tris Hcl e por fim as lâminas foram montadas com Prolong Gold antifade (cat# P36930, invitrogen, Calsbad, CA, USA). Os controles negativos foram feitos simultaneamente para cada anticorpo, incubados com IgG2b mouse (1:100; Cat#ab91366, abcam, Cambridge, UK), para confirmar a especificidade dos anticorpos.

As lâminas foram analisadas usando o microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Göttingen, Alemanha) sob objetiva de 400x e usando o filtro Zeiss 02 (filtroDAPI), filtro Zeiss 03 (filtro FITC). Imagens digitais foram adquiridas usando AxioVision software (Zeiss) e câmera de alta resolução Zeiss AxioCam MRM.

6.2.2.4.3 *Imunohistoquímica*

Para a contraprova das células marcadas pela citometria de fluxo, realizamos a marcação celular com anticorpo CD117 (C-kit). O protocolo utilizado para o anticorpo CD117 (C-kit), DAZL e GFRA1, segue abaixo:

Os testículos foram fixados em paraformol 10% e emblocados em parafina, posteriormente os blocos foram cortados em secções de 5µm; as lâminas foram diafanizadas em xilol e desidratadas em banhos decrescentes de concentração de etanol. A recuperação antigênica se deu pela imersão dos cortes em solução tampão citrato de sódio 0,01M, (pH 6,0) na panela de pressão por 1 minuto a 120°C e a atividade da peroxidase endógena foi inibida com 6%v/v H₂O₂/H₂O destilada v/v por 30 minutos em câmara escura. As secções foram bloqueadas por 1 hora 30 minutos em 5% de solução de leite, em seguida, incubadas com os anticorpos primários anti-rabbit policlonal C-kit (1:1000, Cat#ab5506, Abcam, Cambridge, UK) 4°C por 24 horas, os controles negativos foram processados simultaneamente e incubados com IGg anti-rabbit (1000; abcam, Cambridge, UK). Após lavagens subsequentes em TBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário estrepto-avidinabiotina-peroxidase (ABC kit, Vector Labs, UK), utilizado conforme indicação do fabricante.

Posteriormente, as amostras foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) (diaminobenzidine, Dako, USA) e contrastadas com Hematoxilina, a avaliação da imunoexpressão se deu por meio do microscópio óptico Zeiss Axioplan 2 e imagens digitais foram adquiridas usando AxioVision software (Zeiss) e câmera de alta resolução Zeiss AxioCam MRM.

6.2.3 Resultados

Os resultados a seguir referem-se à obtenção, isolamento e caracterização das células tronco espermatogoniais adultas canina *in vitro*.

6.2.3.1 Análise morfologia do Testículo Canino

A análise morfológica foi realizada em cinco animais com idade entre 3-6 meses. Os Testículos caninos, pesaram em média 2,09±3,24g. os testículos direitos e 2,99±3,17g os esquerdos (Tabela 1) (Figura 17A).

Tabela 1 - Média e Desvio padrão do peso (gramas) dos testículos caninos

Animais	Testículo Direito (g)	Testículo Esquerdo (g)
1	0,94	0,94
2	10,98	10,58
3	1,82	1,44
4	1,72	1,28
5	1,64	1,2
7	1,4	1,2
6	0,86	0,81
8	0,48	0,46
9	0,49	0,52
10	0,53	0,57
Média	2,09	2,99
Desvio padrão	3,24	3,17

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

A Análise histológica do testículo canino revelou que este é composto pela túnica albugínea, que libera septos e divide o parênquima testicular em lóbulos. Estes lóbulos são formados por túbulos seminíferos compostos por: túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular (Figura 17B-D).

A túnica própria é uma fina camada composta por matriz extracelular e células mióides, próximas a estas células encontram-se a membrana basal com células de Sertoli e espermatogônias (Figura 17E). No interior dos túbulos, o epitélio estratificado era composto por espermatogônias e células de Sertoli, localizadas entre a membrana basal e o lúmen tubular. Assim, na camada basal as espermatogônias apresentavam-se como células pequenas com núcleo grande e arredondado (Figura 17E).

Entre o túbulo seminífero no compartimento intertubular, há presença de células intersticiais ou células de leydig, as quais estão envoltas por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 17D).

Figura 17 - Fotomacro e fotomicrografias dos testículos caninos

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Evidenciamos em (A) os testículos. (B) e (C) parênquima testicular (Pt) e os túbulos seminíferos (seta) constituídos de túnica própria (Tp). Em (D) e (E) túbulos seminíferos, composto por epitélio seminífero (Es) com células mióides (*) e lúmen (L), envolvidos por tecido conjuntivo frouxo (Tc) e vasos sanguíneos. Destacamos células da linhagem espermatogênica, células de Sertoli (seta azul); espermatogônias (seta amarela). Coloração:H/E. Barra: 20µm.

6.2.3.2 Cultivo Celular e Fatores de Crescimento

Foram plaqueadas 1×10^6 células em placas de 24 poços contendo 2 ml de DMEM/FBS, Piruvato (1µl/ml), Lactato (0,1 µl/ml) e fatores de crescimento, os quais obtiveram êxito no cultivo com estas células. Realizaram-se duas formas de cultivo, com e sem a monocamada de fibroblasto embrionário canino (CEF), os quais apresentaram diferentes resultado quanto aos aspectos de cultivo celular.

Os resultados após 2 dias em cultivo demonstraram diferenças quanto a aderência e apresentação celular; as células sem CEF não foram aderentes, e estavam dispersas na

superfície. (Figura 18A-C), enquanto, que as células cultivadas com monocamada fibroblástica apresentaram grandes números de células arredondadas, formando aglomerados celulares, as quais se espalhavam sobre a placa. (Figura 18D-F).

Após 2 semanas de cultivo, a proliferação das células germinativas espalhou-se nas laterais da placa, no qual havia maior número de colônias (Figura 19 A-D), mantendo-se estável após quatro semanas de cultivo (Figura 19E). Em geral, a presença da monocamada aumentou o número de células germinativas sendo possível prolongar o tempo de cultivo por aproximadamente 30 dias.

Figura 18 - Fotomicrografias do cultivo das células SSCs caninas

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A); (B) e (C) SSCs sem a monocamada de fibroblastos embrionários canino (CEF). Nota-se diferentes tamanhos celulares (setas e asteriscos) dispersas na superfície da placa, após 2 dias de cultivo. (D); (E) e (F) SSCs sobre a monocamada de fibroblasto embrionário canino (CEF), observa-se grande número de células redondas (seta) aderidas a monocamada, formando aglomerados celulares (circulo pontilhado). Barra: 100μm.

Figura 19 - Fotomicrografias cultivo de células SSCs caninas

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: **(A)** Com 2 dias de cultivo, nota-se que a formação de colônias, **(B)** 5 dias de cultivo aumento do número de colônias, **(C)** com 10 dias de cultivo e **(D)** com 15 dias de cultivo. **(E)** após 4 semanas, nota-se a presença de células grandes e arredondadas (seta). Barra: 100µm.

6.2.3.3 Isolamento e enriquecimento das células tronco espermatogoniais *in vitro*

Após o isolamento obtivemos em média $3,2 \times 10^6$ células espermatogoniais em suspensão. O gradiente descontínuo de percoll associado ao plaqueamento diferencial separaram significativamente e aumentaram a viabilidade e tempo de cultivo, para em média $1,4 \times 10^6$, enquanto que e antes do enriquecimento foi de $3,2 \times 10^6$ (Tabela 2).

Tabela 2 - Viabilidade das células antes e após o enriquecimento com gradiente descontínuo de percoll (27-35%)

Animais	Enriquecimento- Gradiente Descontínuo Percoll	
	Antes (10⁶)	Após (10⁶)
1	5,54	0,63
2	4,98	0,92
3	1,87	2,07
4	1,58	0,75
5	2,27	2,5
Média	3,2	1,4

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

O gradiente descontínuo de percoll, diminuiu eventuais contaminações com células somáticas (células de Sertoli, mióides e de Leydig), que são frequentes antes do enriquecimento. Contudo, notou-se na densidade entre 27-35% uma pequena quantidade de células, as quais foram recolhidas e plaqueadas (Figura 20). Entretanto, mesmo adotando esta técnica, ainda notamos células somáticas presentes na cultura.

Para diminuir ainda mais esta contaminação, realizamos o plaqueamento diferencial que demonstrou ser bastante eficaz uma vez que as SSCs quando replaqueadas, não apresentavam grande quantidade de fibroblasto na nova placa (Figura 20C).

Todas as culturas começaram com uma população mista de células incluindo o tipo A espermatogônias caninas e células somáticas. A porcentagem de contaminação com células somáticas foi cerca de 50% antes do plaqueamento diferencial, e, em seguida, caindo para 20% após centrifugação em gradiente descontínuo de percoll (Figura 20).

Figura 20 - Fotomicrografias células SSC scaninas em cultivo

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: **(A)** sem enriquecimento com o percol, presença de espermatozoides (seta). **(B)** Depois do enriquecimento do percol com 0 dia de cultivo. **(C)** pós plaqueamento diferencial sobre a monocamada fibroblástica, formação de aglomerado celular (circulo). **(D)** Células sobre a monocamada fibroblástica após 10 dias de cultivo. Barra:100µm

Adicionamos alguns fatores importantes no cultivo das SSCs, como: Fator inibidor de leucemia (LIF) e Fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e realizamos um experimento, no qual testamos o tempo de cultivo e adição ou não destes fatores (Tabela 3).

Tabela 3 - Experimento demonstrando adição de fatores de crescimento em relação ao tempo de cultivo, avaliando o número de células ($\times 10^4$)

Dias	LIF²	LIF +bFGF	bFGF¹	Controle
1	44	44	44	44
2	25	21,5	16	16,5
5	1	12	0,125	3,75
10	1	5	3	7
Média	17,75	20,62	15,78	17,81

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Nota :¹Fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF); ²Fator inibidor de leucemia (LIF).

Na tabela 3 demonstramos que a adição de LIF+ bFGF promove um aumento de em média 20,62% do número de células em cultivo, quando comparado com a média (17,81) de células cultivadas sem estes fatores.

Utilizando o LIF ou bFGF obteve-se em média 18% de células viáveis em cultivo, sendo que a maior porcentagem de células era com 2 dias de cultivo, diminuindo com o tempo e chegando a 1×10^4 células/placa. Portanto, quando adicionamos LIF+bFGF havia em média 21% de células viáveis em cultivo, e este também diminuiu com o tempo de cultivo. Entretanto, neste experimento as células não foram cultivadas sobre a monocamada fibroblástica embrionária, possivelmente à perda de células com o tempo de cultivo pode estar associada à falta da monocamada.

Fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) na concentração de 1 μ l/ml influenciou a proliferação, entretanto a ausência de bFGF conduziu a uma aparência semelhante a fibroblastos e uma diminuição das taxas de proliferação de SSCs. Com a presença de fatores de crescimento observou-se melhor morfologia das SSCs, mesmo sem a monocamada fibroblástica e aumento no tempo de cultivo. Entretanto, quando adicionado o fator de crescimento fator inibitório leucemia (LIF) na concentração de 1 μ l/ ml e bFGF na concentração de 1 μ l/ml, notamos o desenvolvimento das SSCs e aumento do número de formação colônias e aglomerado celulares (Figura 21).

Figura 21 - Células SSCs caninas 0 e 10 dias de cultivo, após o enriquecimento com percoll e plaqueamento diferencial

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A) e (B) Placas sem adição de fatores de crescimento: LIF e bFGF, presença de espermatozoides (asterisco) e grande quantidade de células mortas (seta). (C) e (D) placas após 30 dias de cultivo com a presença de fatores de crescimento, formação de aglomerado celular. Barra:100µm.

6.2.3.4 Formação de colônia

6.2.3.4.1 Morfologia das células tronco espermatogoniais *in vitro*

Todos os cultivos iniciavam com uma população mista de células, incluindo células espermatogônias e células somáticas. O cultivo as SSCs mostraram morfologia típica de espermatogônias, com células arredondadas ou ovais e núcleo espiral relacionado com o citoplasma; apareciam isoladas, em pequenos grupos e formavam aglomerados celulares na placa (Figura 22 A-B).

As SSCs isoladas tendem a se reunir e formar grupos de células pequenas, denominando aglomerados celulares. As colônias de SSCs eram formadas por células em suspensão, que se dispunham em algumas áreas específicas da placa, principalmente próximas as bordas (Figura 22 C-D).

Agregados celulares surgiram após o plaqueamento diferencial com 3-5 dias, e apresentavam junções intercelulares próximas, com as bordas exibindo um limite claro. Resultavam em uma massa convexa de células com fronteiras claras que se espalhavam livremente nas regiões exterior para formar grupos satélites (Figura 22E).

As SSCs após este período mantiveram-se estáveis, gerando colônias com as mesmas características morfológicas de espermatogônias, exibidas na primeira semana de cultivo.

Figura 22 - Fotomicrografias das células SSCs caninas

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A) Morfologia típica das espermatogônias, identificadas como: células arredondadas ou ovais, núcleo espiral relacionado com o citoplasma (círculo). (B). Após 10 dias de cultivo, as espermatogônias apresentavam diferentes formatos sendo, únicas (seta) ou em pequenos grupos (círculo pontilhado), formando aglomerados celulares (asterisco). (C) e (D) formação de colônia por células em suspensão (colchetes). (E) colônias com morfologia única, sendo esta compacta no centro e com extremidades livres. Barra:100μm.

6.2.3.4.2 Imunofenotipagem- Identificação das espermatogônias

Os resultados referentes ao CD49f por imunohistoquímica no testículo de cães com 3 meses de idade revelou a expressão em células localizadas na membrana basal do túbulo seminífero, sugerindo que este marcador é expresso em espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas, bem como em algumas células intersticiais (Figura 23).

Figura 23 - Fotomicrografias da imunofluorescência dos testículos caninos com o marcador molecular CD49f

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A); (B) e (C) Imunolocalização das células positivas na membrana basal do túbulo seminífero em espermatogônias indiferenciadas (seta), e em células intersticiais (asterisco). (D) e (E) células imunopositivas localizadas na membrana basal do túbulo seminíferos Barra: 20µm.

O C-kit (CD117) destacou populações diferentes de células germinativas compostas por agregados de células localizadas na membrana basal (espermatogônias tipo A; e espermatogoniais diferenciadas), porem a imunorreatividade foi baixa (Figura 24).

Avaliamos a expressão da proteína DAZL nos testículos dos cães e notamos a expressão em células localizadas no lúmen do túbulo seminífero, sendo em espermatócitos paquíteno, preleptoteno, leptóteno, zigóteno e espermatogônias. Não obtivemos marcação em

células de Sertoli e espermatídes. A proteína GFRA1 foi expressa apenas em espermatogoniais tipo A, localizadas na membrana basal do túbulo seminífero, no compartimento adluminal (Figura 24).

Figura 24 - Fotomicrografias da análise imunohistoquímica das proteínas C-kit (CD117t), DAZL e GFRA1 em testículos de cães pré-púberes

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A) e (B). Nota-se populações diferentes de células germinativas imunopositivas para CD117, localizadas na membrana basal. Observou-se também a expressão em algumas espermatogônias (seta vermelha) e células intersticiais (asterisco). (D) e (E) Células positivas para DAZL, células em meiose, espermatogônias tipo B (Al) e espermatócitos (ES); (G) e (H) Células localizadas no compartimento basal dos túbulos seminíferos, positivas para GFRA1 (seta preta). (C), (F) e (I) Controles da reação. Barra: 20μm.

Após a caracterização *in vivo*, de marcadores específicos para células germinativas, realizou-se análise da expressão dos marcadores de superfície nas células germinativas coletadas dos testículos e mantidas *in vitro*. Portanto, inicialmente avaliamos a expressão dos marcadores de superfície, Thy-1 (CD90), CD49f, C-kit, DAZL e GFRA1.

O CD90 (THY-1) mostrou como tendência aumentar a expressão aos 15 dias de cultivo, sendo o valor de $p=0,18$ ($p>0,05$). A expressão $\alpha 6$ integrina (CD49f) oscilou de acordo com os períodos estudados; mostrando-se positivas entre 0 e 9 dias de cultivo e após esse período a um decréscimo da expressão. Aos 10 dias de cultivo houve um aumento da porcentagem de células positivas, que diminuiu significativamente aos 15 dias de cultivo. Desta forma, CD49f demonstrou maior tendência de expressão com 10 dias de cultivo, sendo $p=0,058$ ($p>0,05$), entretanto a variabilidade entre os indivíduos deve ser considerada.

O imunomarcador CD117 (C-kit) marca espermatogoniais diferenciado tipo B e demonstrou maior porcentagem de células positivas visualizadas aos 10 dias de cultivo, com crescimento significativo entre 0 a 10 dias de cultivo, tendendo a diminuir após os 10 dias (Figura 25).

Figura 25 - Análise de citometria de fluxo com os marcadores CD49f, CD117 e CD90, aos 0, 5, 10, 15 e 30 dias de cultivo das células germinativas caninas

Fonte: (PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: **(A)** histogramas das células germinativas adultas e **(B)** análise estatísticas da porcentagem de células positivas vs. o tempo de cultivo dos marcados CD49f; CD117 (C-kit) e CD90.

Avaliamos a imunopositividade das células para DAZL e GFRA1, e notamos que as células foram positivas para estes dois marcadores. No dia 0, tivemos uma maior porcentagem de células GFRA1 positiva e menos células que expressavam DAZL. Aos 5º dia de cultivo as células passam a expressar menos GFRA1 e mais células são DAZL positivas, e o final do cultivo (15º dia) houve uma diminuição da expressão destes dois marcadores (Figura 26).

Figura 26 - Análise citometria de fluxo dos marcadores biomoleculares GFRA1 e DAZL

Fonte: (PIERI, N. C. G, 2016).

Legenda: **(A)** Análise de citometria de fluxo dos marcadores biomoleculares GFRA1 e DAZL. **(B)** Gráfico com a porcentagem de SSCs de cães com 3 meses de idade, positivas após T0, T5 e T15 dias de cultivo **(C)** Histograma das células GFRA1 positivas, com T0, T5 e T15 dias; **(D)** Células DAZL positivas para os mesmos períodos.

A análise por citometria de fluxo destacou que comparativamente as células isoladas não enriquecidas com gradiente de Percoll aos 10 dias de cultivo, apresentaram população, mas homogênea quanto ao tamanho (*forward scatter* – FSC) e granulosidade (*side scatter* – SSC), sugerindo que há uma seleção de células de crescimento rápido como fibroblastos. Já as células enriquecidas por percoll apresentaram uma população mais homogênea e positiva para CD49f, assim estes resultados sugerem que o enriquecimento por gradiente discontinuo de Percoll diminui a contaminação por células intersticiais (Figura 27).

Figura 27 - Análise de citometria de fluxo com o marcador biomolecular CD49f (integrina alfa6) com 10 dias de cultivo

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A) Cultura celular sem enriquecimento com Gradiente descontinuo de percoll. (B) cultivo celular com enriquecimento de percoll.

6.2.4 Discussão e Conclusão

Em várias espécies as espermatogônias tronco (SSCs), representam uma pequena porcentagem de células no testículo. Em camundongos de acordo com Meistrich e Van Beek (1993) as SSCs representam 10^8 células, sendo aproximadamente 2×10^4 as células tronco, em humanos adultos 1 em cada 5000 células (DEJARDINS; EWING, 1993), seguindo estes preceitos realizamos formas diferentes de enriquecimento celular, para adquirir uma população significativamente mais pura de SSCs caninas e para futuras aplicações. Uma vez que, o sucesso do xenotransplante das SSCs esta relacionado a vários fatores, dentre eles o microambiente *in vitro* (SHINONHARA et al., 2002).

Meistrich e Van Beek (1993) descrevem que células tronco espermatogoniais (SSCs), são as únicas células tronco em tecidos adultos, capazes de dividir mitoticamente e contribuir com genes para as gerações seguintes, segundo os autores são células importantes para a biologia experimental, pesquisas médicas e biotecnologia, portanto cultivamos e caracterizamos as células germinativas caninas, para gerar um modelo no tratamento de infertilidade e para produção de animais indispensáveis para a pesquisa.

Morfologicamente as espermatogônias caninas, apresentam-se redondas ou ovais, com núcleo grande e espiral, sendo o contato núcleo/citoplasma alto,, igualmente descritas por Kierzenbaum (1994); Yuan et al. (2009) camundongos; Izadyar et al. (2011) em humanos e Heidari et al. (2012) em cabras. Células germinativas caninas isoladas tendem a se reunir e formar grupos de células pequenas, denominando aglomerados celulares, estes são formados por células em suspensão, que espalham em algumas áreas da placa, principalmente próximas as bordas, conforme mencionam Yuan et al. (2009) em cultivo de espermatogônias tronco de camundongo, os quais formavam aglomerados após a oitava passagem.

Heidari et al. (2009) revelam que as células germinativas de cabras após 1 semana de cultivo apresentavam diferentes formas na placa, podendo ser encontradas sozinhas, em pares ou em aglomerados celulares e mencionam que em poucos dias as células somáticas confluíram em monocamadas e as espermatogoniais cresciam na superfície, semelhante aos nossos cultivos de células germinativas caninas, como o citado por Harkey et al. (2013) em células germinativas caninas.

Koruji et al. (2009) citam que a purificação de espermatogônias tronco de camundongos adultos é mais difícil do que de imaturos ou neonatal. Izadyar et al. (2002) demonstraram a maior purificação de espermatogoniais tipo A, sendo 65-87% testículos de bezerros com 5-8 meses, desta forma neste experimento com células germinativas caninas, obtivemos maior sucesso em cultivo com testículo de animais entre 3-6 meses, por apresentarem maior porcentagem espermatogônia tipo A.

As SSCs são células limitadas nos testículos dos animais domésticos, assim é necessário isolar e enriquecer as SSCs com maior viabilidade e purificação para cultivar ou manipular estas células *in vitro*, portanto várias formas de enriquecimento estão sendo estudadas (ZHENG et al., 2014), assim neste experimento utilizou-se o enriquecimento, por meio do plaqueamento diferencial e gradiente descontínuo de percoll, o qual adquirimos maior porcentagem de células CD49f positivas, demonstrando uma menor contaminação por células intersticiais, conforme descrito Izadyar et al. (2003); Goel et al. (2010) e Herrid et al. (2009) em bovinos, obteve-se um resultados de 70-55% de purificação de espermatogônias,

sendo a maior purificação descrita por Ahmad et al. (2013), chegando a 90% em testículos de búfalos.

Neste experimento, utilizamos várias técnicas para isolar e purificar as SSCs, avaliamos as frações 27-35%, o qual encontramos o maior número de SSCs positivas para CD49f, da mesma forma que Wang et al. (2008) em cultura de camundongos, citam que 70% das SSCs expressavam C-kit, mostrando que havia uma grande quantidade de células espermatogoniais.

Izadyar et al. (2002) e Herrid et al. (2006) em seus experimentos realizaram o plaqueamento diferencial, importante para eliminar as células somáticas, os quais ficam aderidas a placa de cultivo. Sendo assim, no cultivo das células germinativas caninas notamos que o gradiente descontinuo de percoll associado ao plaqueamento diferencial, separaram significativamente as células, aumentaram a viabilidade e tempo de cultivo destas células, da mesma forma que citado por Silva et al. (2012) no cultivo de SSCs felina.

Outro importante fator para o cultivo das células tronco espermatogoniais é adição de fatores de crescimento com o bFGF - Fator Crescimento de Fibroblasto Básico, conforme mencionado por Hofmann.; Braydich-Stolle e Dym (2005) em camundongos e Elidermann et al. (2012) em cultura de SSCs de primatas, este fator conduz o crescimento das SSCs, autorrenovação e a formação de aglomerados celulares, semelhante aos nosso achados, os quais influenciou a proliferação e a sobrevivência das SSCs, entretanto a ausência de bFGF conduziu a uma aparência semelhante a fibroblastos e uma diminuição das taxas de proliferação.

Kubota et al. (2004) reportaram efeito negativo da adição de bFGF na habilidade de colonização das espermatogônias tronco, quando tratadas com mais de 1ng/ml de bFGF, entretanto as células germinativas caninas este fator associado ao LIF aumentou visualmente o número de colônias e o número de células viáveis.

O LIF é um importante fator para a regulação das células tronco, e está vinculado a um receptor heterodímero, que inclui Lif-específico ligado a subunidades de sinalização transducional da transmembrana a subunidade IL-6ST. Ligando o LIF num complexo receptor resulta na fosforilação das várias tirosinas residuais, que por atividade da Janus tirosina kinase (JAK), ativa o sinal de transdução e o fator 3 de transcrição (STAT3). Este sinal de acordo com Meistrich e Van Beek (1993) e Taga e Kishimoto (1997), promove uma cascata que mantém autorrenovação das células tronco, por esta razão o LIF em nossos cultivos foi fundamental para formar aglomerados celulares, que são resultados da autorrenovação celular, segundo Kubota et al. (2011).

As SSCs caninas cultivadas com monocamada fibroblástica embrionária canina (CEF), apresentavam-se em grandes números de células arredondadas aderidas a CEF, as células formavam aglomerados celulares, as quais espalhavam-se sobre a placa, assim de acordo com Smith et al. (1992) e Shinonhara et al. (2005), esta promove uma associação entre as células tronco e monocamada, por meio de fatores de crescimento e citosinas, os quais auxiliam na autorrenovação e sobrevivência das células *in vitro*.

De acordo com Nanago et al. (1998) o sucesso do cultivo por longos períodos resultando na espermatogênese seguida do transplante das SSCs em camundongo, esta ligado a STO (monocamada fibroblástica embrionária de camundongo), segundo os autores esta é fundamental para manter SSCs *in vitro*, concomitantemente neste estudo, a presença da monocamada e fatores de crescimento, aumentaram o número de espermatogônias indiferenciadas (20%) e o grau de autorrenovação destas células, da mesma forma que mencionado por Heidari et al. (2012) em cabras, mas diferentemente Brinster (2002) menciona que apenas 10-20% das SSCs de camundongos mantem-se vivas após 1 semana em cultivo.

A autorrenovação é considerada uma função autônoma das células tronco, todavia manter e expandir esta célula *in vitro*, pode ser alcançado por inibição da morte celular e diferenciação (NAGANO et al., 2003), portanto segundo os autores a adição de fatores que impeça a diferenciação promovem aumento de SSCs, em nossos estudos o enriquecimento juntamente a adição de fatores de crescimento e monocamada fibroblástica embrionária canina, fizeram com que estas células fossem mantidas por 30 dias em cultivo, conforme relatos de Nanago et al. (1998) e Kanatsu-Shinonhara et al. (2003) e Baazm et al. (2013), que afirmam que a sobrevivência das SSCs *in vitro* esta relacionado à condição de cultura.

Shinonhara et al. (1999) menciona que as espermatogônias exibem fenotipicamente maior expressão de $\alpha 6$ e $\beta 1$ integrinas, em nosso experimento tivemos a expressão de $\alpha 6$ -integrina (CD49f) e C-kit (CD117) e contrapondo nossos achados Ohta et al. (2000) em camundongos e Maki et al. (2009) em primatas adultos, citam a não expressão de C-kit em espermatogônias tronco.

Embora, várias pesquisas utilizam o C-kit como específico marcador de espermatogônias diferenciadas (YOSHINAGA et al., 1991; ROSSI et al., 2000). Yuan et al. (2009) menciona que uma pequena população de SSCs expressava esta proteína antes da formação dos aglomerados celulares, diferentemente dos encontrados nas espermatogônias caninas, as quais expressavam maior porcentagem de células C-kit positivas aos 10 e 30 dias de cultivo.

A marcação de C-kit (20-60%) nas células tronco germinativas de acordo com Dan et al. (2008) tem demonstrando que estas células em cultivo, apresentam características heterogênicas, pois este é marcador de espermatogônias diferenciadas e indiferenciadas, portanto em células tronco germinativas caninas, encontramos a marcação desta proteína.

Yuan et al. (2009) caracteriza fenotipicamente as células SSCs de camundongos sendo positivas para THY-1(CD90), OCT4, SSEA1 e subpopulações C-kit, da mesma forma as células germinativas caninas foram imunopositivas para Thy-1 e C-kit. Xiu et al. (2010) realizaram estudos com espermatogônias de búfalos *in vitro*, nestes muitas destas células mostram ser C-kit positiva, indicando que as células eram diferenciadas, conforme observado em testículos caninos e Izadyar et al. (2003) em bovinos, o qual citam que 80% das espermatogônias nos testículos dos animais com 5 meses expressavam C-kit.

He et al. (2010) descreveram a expressão de CD49f na membrana citoplasmática de espermatogônias, células de Sertoli e células de Leydig, igualmente visualizados por meio da imunofluorescência dos testículos caninos, entretanto diferentemente dos humanos, nos cães não há expressão em células de Sertoli, igualmente mostrado por Maki et al. (2009) em primatas.

Imunohistoquimicamente, no testículo humano o CD49f (IZADYAR et al., 2011) marcou as células localizadas na membrana basal dos túbulos seminíferos, sugerindo a imunomarcação em espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas, além de células intersticiais, similar aos nossos achados em testículos caninos. Os autores também citam que por meio da citometria de fluxo e imunohistoquímica, foi possível notar distintas população de células CD49f e THY-1 positivas, diferente dos encontrados em cães no qual, em uma mesma população obtivemos células positivas para estas duas proteínas.

As espermatogônias caninas apresentam as mesmas características fenotípicas de roedores, primatas e humanos, pois segundo He et al. (2010); Hermann et al. (2009), as SSCs expressão GFRA1 e THY-1, indicando que estas duas proteínas são conservadas entre as espécies e podem ser usados para selecionar espermatogônias.

Nasiri et al. (2012) mencionam a expressão de CD49f e THY-1 em SSCs bovinas, após 7 dias de cultivo, diferentemente das células espermatogoniais caninas aos 5 dias de cultivo, apenas 8% das células eram positivas para CD49f, e negativas para THY-1, entretanto após 15 dias 18 % das células eram positivas para THY-1 e com 10 dias 20% das células eram CD49f e C-kit positivas.

Lee et al. (2014) identificaram os tipos celulares por imunohistoquímica nos testículos de cães de 2, 3 e 12 meses, e encontrou a expressão de PGP9.5 e DAZL, de acordo com o

autor o DAZL foi identificado em espermátócitos unicamente, diferentemente dos nossos achados no qual identificamos marcação positiva em espermatogoniais diferenciadas. Entretanto, o autor supracitado não obteve marcação para GFRA1, e em nosso estudo com testículos de cães, nos observamos células imunopositiva para esta proteína.

Travis et al. (2013) menciona que um aglomerado de células germinativas caninas com morfologia similar expressou vários marcadores de SSCs em cultura, incluindo DAZL, UCHL1, AP180 e VASA, assim como relatado em nossos resultados. Avaliando a expressão da proteína DAZL pelo período de tempo em cultivo encontramos uma baixa expressão nos primeiros dias de cultivo, e posteriormente aos 5 dias de cultivo houve um pico desta proteína, demonstrando a diferenciação destas células, seguido pelo declínio da expressão deste marcador.

Nossos resultados revelaram que o enriquecimento, a adição de fatores de crescimento e o cultivo sobre uma monocamada de fibroblastos embrionários caninos, são essenciais para se obter uma população mais pura de SSCs caninas, conforme mencionado por Zheng et al. (2014). O contato direto com células somáticas promove um nicho funcional, o qual permite autorrenovação celular. A análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo destas 5 proteínas de superfície revelou que as células do testículo canino quando cultivadas, apresentam maior expressão aos 10º dia de cultivo de CD49f, CD117 (C-kit) e GFRA1, sugerindo ser este o melhor período para a realização do experimento de xenotransplante.

Capítulo 3- (Experimento 3)

Comparação *in vivo* e *in vitro* das células tronco espermatozoniais de cães
pré-púberes e adultos

6.3 EXPERIMENTO 3 - COMPARAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DAS CÉLULAS TRONCO ESPERMATOGONIAIS DE CÃES PRÉ-PÚBERES E ADULTOS

6.3.1 Delineamento Experimental

Esta etapa foi desenvolvida para avaliar e caracterizar a população de SSCs de cães em diferentes idades reprodutivas e poder determinar a melhor faixa etária para o sucesso do xenotransplante entre estas espécies. As células foram coletadas do testículo de cães em três faixas etárias diferentes: pré-púberes (<3-6 meses) púberes (<6-12 meses) e adultos (>12 meses), sendo caracterizadas *in vitro* por imunocitoquímica, imunohistoquímica com os marcadores GFRA1, DAZL, PLZF e STRA8 e citometria de fluxo para os marcadores GFRA1, DAZL, PLZF, C-kit, STRA8 e OCT4 (Figura 28).

Figura 28 - Delineamento Experimental

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

6.3.2 Material e Métodos

6.3.2.1 Coleta das Amostras

Para este experimento foram coletados os testículos de três cães de cada fase reprodutiva pré-púberes (<3-6 meses) púberes (<6-12 meses) e adultos (>12 meses), as análises de imunofluorescência (citometria de fluxo), foram realizadas nos períodos de 0, 5, 10 e 15 dias de cultivo, com o intuito de avaliar as características e comportamento das SSCs dos animais adultos e pré-púberes *in vitro*, e verificar se há uma diferença no comportamento *in vitro* destas células relacionado a idade dos animais. Para controle realizamos testes imunohistoquímica com os anticorpos DAZL, PLZF, GFRA1 e STRA8 para verificar as especificidades.

6.3.2.2 Análise Imunohistoquímica

Para esta análise foram coletados testículos de cães nas fases pré-púberes (n=3), púberes (n=3) e adultos (n=3), todas as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, em seguida, foram embebidos em parafina de acordo com Luna (1968). Para a recuperação de epítipo as amostras foram fervidas em tampão de citrato (0,01 M; pH 6,0) durante 20 minutos em microondas. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com 3% de H₂O₂ em metanol durante 20 minutos em câmara escura. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com leite 5% em tampão tris salinos (TBS). As lâminas foram incubadas com GFRA1 (1:50, Cat#sc10716, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), DAZL (1:60, Cat#ab34139, Abcam, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido), PLZF (1:50, Cat#sc22839, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e STRA8 (1: 100, Cat#ab49602, Abcam, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) durante a noite a 4°C. O anticorpo primário foi omitido dos controles negativos. As lâminas foram lavadas em TBS contendo 0, 5% de Triton X-100 (TBST), e incubaram-se previamente kit Dako (HRP K4069, Dako, USA). Para obter descrições microscópicas do testículo, as lâminas foram analisadas em um microscópio de luz (Zeiss, Göttingen, Alemanha) na objetiva de 200x e 400x.

Para análise estatística calculamos a porcentagem de células positivas por anticorpo empregado e analisamos as espermatogônias tipo A imunomarcadas para GFRA1 e PLZF, as células foram contadas em 10 testículos seminíferos por animal no microscópio Zess (Zeiss, Göttingen, Alemanha) na objetiva de 400x. A imagem digital foi adquirida usando software AxioVision (Zeiss) (LEE et al., 2014), Análises estatísticas para imuno-histoquímica foram realizados pelo teste T (não-paramétrico) e pela análise de variância (Graphapard Prism 4).

6.3.2.3 Cultivo Celular

As amostras foram coletadas a partir dos testículos de cães com idade reprodutiva: pré-púberes (n= 3) e adultos (n= 3), estes foram cultivados com mencionado no ***Experimento 2- Caracterização das células tronco espermatogonial (SSCs)***.

Sucintamente a metodologia empregada foi a adição de cinco vezes o volume (v/p) da enzima collagenase de tipo IV (0,5 mg / ml; Cat # 5138, Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA) as células por 60 minutos, em seguida foram lavadas em meio de cultivo DEMEN F12 (Cat #BR-30004-05, LGC, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Cat#12657029, Gibco, invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 6mM de L-Glutamine (Cat#25030-081, invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,5mM de Piruvato (11360-070, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), 10.000 U/ml de Penicilina e Espectromicina (Cat#15140-122, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 100 U/L de anfotericina B (Cat# A2942, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) e após a digestão enzimática, as células foram filtradas usando peneira de 70-µm de nylon (Cat#352350, Corning Life Sciences, N.Y., United States). As células foram purificadas por meio do gradiente de densidade de Percoll (P1644, Percoll®, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) nas densidades de 11%, 19%, 27%, 35% e 43% diluída em solução Locker (90g NaCl; 4,17g KCl; 3,02g NaHCO₃; 10,09g de glicose; 50 ml de HEPES 1M, pH 7,4), centrifugado a 800g durante 30 minutos a 25°C (De BARROS et al., 2012). Posteriormente, as células foram recolhidas entre as frações 27-35%, ressuspensas em meio de cultura e incubadas a 38°C em 5% de CO₂ durante 24 horas para futuro plaqueamento diferencial (LIU et al., 2011).

6.3.2.4 Análise Imunocitoquímica

As células tronco espermatogoniais foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 1% de BSA (Albumina de Soro Bovino - Cat#A2153, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), + 0,1% Triton-X-100 (PBT). Em seguida, foram incubadas com bloqueio de 10% de BSA durante 60 minutos. As células foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: GFRA1 (1: 200; sc10716, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) a 4°C durante a noite, E os anticorpos nucleares: STRA8 (1: 200, ab49602, Abcam, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido), PLZF (1: 200; sc22839, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) incubamos as células a 38°C por 1 hora. As células foram incubadas com anticorpo anti-rabbit Alexa 488 (1: 300; Catalog #: A-11034, Invitrogen, Calsbad, CA, EUA) em PBT por 1 hora. Os núcleos foram corados com Hoechst (Trihydrochloride, Trihydrate, cat#33342, Invitrogen, Calsbad, CA, EUA) e as células foram observadas com filtro de excitação verde e microscópio de epifluorescência Zess (Zeiss, Göttingen, Alemanha) na objetiva de 400x. A imagem digital foi adquirida usando software AxioVision (Zeiss).

6.3.2.5 Análise de Citometria de Fluxo

Com análise de citometria de fluxo, avaliamos os marcadores de superfície e nucleares expressos nas células germinativa caninas em diferentes tempos de cultivo. As células tronco espermatogoniais foram coradas com marcadores, anteriormente descritos em outras espécies (IZADYAR et al., 2011; LEE et al., 2014), sendo estes DAZL, GFRA1, C-kit e PLZF, STRA8 e OCT4. Aproximadamente 8×10^4 células germinativas foram usadas na análise por anticorpo. As células foram lavadas em PBS, em seguida colocamos o anticorpo primário com 1% de BSA por 60 minutos, posteriormente as células foram ressuspensas em PBS e incubadas com Goat anti-rabbit (H+L) Alexa 488 (1: 300; Catalog #: A-11034, Invitrogen, Calsbad, CA, EUA). A análise de citometria foi realizada em FACSCalibur Cytometric (BD Cytopeia, Seattle, WA, EUA) e o controle negativo foi preparado com células incubadas sem anticorpo.

A expressão das células positivas no testículo de cães pré-púberes e adultos, analisadas na citometria de fluxo foram calculadas comparando-se a porcentagem de células positivas por anticorpo versus o tempo de cultivo. A segunda análise foi realizada comparando-se a idade (pré-púberes e adultos) versus dias de cultivo para cada anticorpo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA (2ways) e Sidak and Fisher's test (Graphapard Prism 6). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6.3.3 Resultados

6.3.3.1 Imunolocalização de Células Germinativas Caninas *in vivo*

Nesta pesquisa utilizou-se cães sem raça definida em diferentes idades reprodução, pré-púberes, púberes e adultos, sendo avaliados os tipos de células germinativas caninas presentes nos testículos durante estas fases por meio da análise histológica e imuno-histoquímica. Em animais pré-púberes, observamos dois tipos de células nos túbulos seminíferos, spermatogônias tipo A e células de Sertoli, enquanto em animais púberes foram observados espermatócitos pré-leptotênicos / leptotenes, ambos localizados próximos a membrana basal; espermatócitos paquíteno entre as espermatídes arredondadas. Nos animais adultos, observou-se os túbulos seminíferos em processo espermatogênico completo, com spermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides presentes no epitélio seminífero.

A análise imuno-histoquímica das células germinativas caninas com os marcadores GFRA1, DAZL e PLZF, revelou que estes eram expressos em spermatogônias indiferenciadas nos cães pré-púberes, púberes e adultos, enquanto STRA8 foi localizado apenas em spermatogônias indiferenciadas no testículo dos cães pré-púberes e spermatogônias diferenciadas e espermatócito em púberes e adultos (Figura 29 e 31).

GFRA1 foi imunolocalizada em algumas células ligadas à membrana basal dos túbulos seminíferos em todas as idades, mas não em todos os túbulos seminíferos avaliados, como em pré-pubertal e adultos (Figuras 29 e 30). Esta proteína foi expressa em spermatogônias do tipo A e em algumas espermatídes arredondadas, localizadas no lumen do

túbulo seminífero (Figura 30). Não se observou marcação em espermatogônias tipo B, espermatogônias intermediárias, espermatócitos e células de Sertoli.

O número de células positivas para GFRA1, foram maiores nos animais púberes ($2,33 \pm 0,470$), quando comparado com os pré-púberes ($1,067 \pm 0,020$) e adultos ($0,2667 \pm 0,095$), a análise estatística mostrou diferença entre todas as idades reprodutivas ($p > 0,05$) (Figura 32A e B). Estes resultados sugerem que testículos de cães pré-púberes apresentam um menor número de células tronco espermatogoniais quando comparado com púberes, talvez porque estes animais não serem madurose estas células estão em senescência celular, enquanto que os púberes têm uma intensa autorrenovação e proliferação celular para manter em funcionamento o processo espermatogênico.

Foi observado células positivas para PLZF nos testículos de todas as idades, e este foi expresso nos núcleos de espermatogônias tipo A e intermediárias (Figura 30). No testículo de cães pré-púberes, as células PLZF-positivas foram encontradas na área central do túbulo seminífero, enquanto que cães adultos a expressão desta proteína foi observada na região adjacente à membrana basal (Figura 29 e 31B). O marcador PLZF variou de uma única célula espermatogonial até dez células marcadas (Figura 2B), enquanto que em animais pré-púberes, foi observado um elevado número de espermatogônias nos túbulos seminíferos, quando comparado com púberes e adultos. A análise estatística mostrou diferenças entre pré-púberes ($5,519 \pm 0,498$), púbere ($1,963 \pm 0,1889$) e adulto ($2,259 \pm 0,2537$) ($p < 0,001$), mas não mostrou diferença entre púberes e adultos ($p = 0,5479$) (Figura 32C e D).

A proteína DAZL foi detectada no testículo pré-púberes nas espermatogônias tipo A,. em cães púberes e adultos esta proteína foi localizadas nas células presente centralmente nos túbulos seminíferos., principalmente em espermatogônia tipo B e espermatócitos (Figura 29 e 30), não estando presente em células de Sertoli, espermatogônias intermediárias, espermatócitos secundários e células de Leydig (Figura 31C).

O marcador nuclear STRA8 foi expresso em espermatogônias tipo A; B e espermatócitos. Em cães púbere e adultos, este marcado foi imunolocalizado em espermatogônias diferenciadas e espermatócitos primários (Figura 30) e em cães pré-púberes a proteína STRA8 foi encontrada em espermatogônias indiferenciadas. Não foi detectada a expressão deste marcador em células de Sertoli, espermatogônia intermédia, espermatozoides e células de Leydig dos testículos caninos analisados (Figura 29 e 31).

Figura 29 - Imunolocalização dos marcadores de células germinativas no processo de espermatogênese canina

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: A ilustração gráfica indica a identificação das células imunopositivas para GFRA1, PLZF, DAZL e STRA8 em diferentes fases da espermatogênese em cães pré-púberes, púberes e adultos. Célula de Sertoli (SE) e membrana basal (BM).

Figura 30 - Marcadores de células germinativas na população de espermatogônias caninas

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A) nos cães maduros sexualmente (adultos) as espermatogônias tipo A (A) representam as células tronco que renovam e fase da proliferação das células germinativas resultando na mitose e diferenciação em espermatogônias intermediária (In), que expressam marcadores GFRA1 e PLZF e por fim diferenciam em espermatogônias tipo B, que expressam os marcadores DAZL e STRA8.

Figura 31 - Análise imunohistoquímica do testículo de cães pré-púberes; púberes e adultos

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A) GFRA1 expresso em células tronco espermatogoniais (A) e em espermatídes arredondadas (SR). (B) DAZL observada expressão em células tronco espermatogoniais (A); espermatogônias tipo B (B) e espermatócitos (SCT). (C) PLZF detecção em espermatogônias indiferenciadas (A) e espermatogônias intermediário (In) (D) STRA8 em tipo A; B e espermatogônias em espermatócitos primário (SCTP). Objetiva de 200x e 400x. Barra 20um.

Figura 32 - Células tronco espermatogoniais (SSC) em testículos de cães pré-púberes, púberes e adultos

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A) células positivas para GFRA1; (B) gráfico destacando média do número de SSCs positivas para GFRA1. Estatística diferentes (* $p > 0,05$) (C) SSCs positivas para PLZF. (D) gráfico comparativo das medias do numero de células positivas para PLZF, adultos. Estatística diferentes (* $p > 0,05$).

6.3.3.2 Análise fenotípica das células germinativas *in vitro*

A análise imunocitoquímica demonstrou que as células germinativas caninas *in vitro* formam aglomerados celulares não-aderentes, os marcadores GFRA1, PLZF e STRA8 foram expressos nas células germinativas de cães pré-púberes e adultos em cultivo (Figura 33A, B e C). O GFRA1 estava presente na membrana de alguns grupos celulares nas duas idades reprodutivas avaliadas, embora mais evidente em cães pré-púberes (Figura 33A). PLZF e STRA8 foram expressos nos núcleos de células germinativas isoladas ou em grupos, nos cães pré-púberes e adultos (Figura 33B e C).

A análise de citometria dos marcadores de superfície e marcadores nucleares GFRA1, DAZL, C-kit, PLZF, OCT4, STRA8 foram utilizadas para caracterização das SSCs dos cães nas fases pré-púberes e adultos. No entanto, a comparação da expressão destes marcados

versus os dias de cultura sobre porcentagem de células positivas, mostrou diferença estatística.

Em cães pré-púberes, GFRA1 apresentou no 5º dia de cultivo 6,09% de células positivas, mostrando uma alta porcentagem de espermatogônias no início do cultivo. No 15º dia este marcador diminuiu sua expressão para 2,62% de células positivas (Figura 33D), indicando, que espermatogônias podem estar diferenciando-se em cultivo ou neste período a taxa de espermatogônias indiferenciadas é baixa. Nos animais adultos o GFRA1 era negativo no início do cultivo, e passa a ser expresso apartir do 10º dia, sendo em média 4,27% das células positivas. Mostrando a baixa porcentagem de células indiferenciadas nesta idade (Figura 33D). Quando comparamos a expressão deste marcador nas idades pré-pubere e adulto não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 34).

Em cães pré-púberes as células foram positivas para OCT4, o qual mostrou uma diferença estatística entre os dias 5º e 10º de cultivo ($p = 0,0330$) e 5º e 15º dias ($p = 0,0414$). No entanto, uma maior porcentagem de células indiferenciadas foi encontrada em pré-púberes aos 10 dias de cultivo, devido ao aumento da porcentagem de células positivas para OCT4 22,16% e este aumento mantém-se até o 15º dia de cultivo 21,27% (Figura 33D). Em animais adultos, a análise mostrou a expressão OCT4 ao 0 dia de cultivo em média (15,44%), mas este diminuiu a expressão entre o 5º e 10º dia e aumentou novamente no 15º dias, 22,45% (Figura 33D). Portanto, OCT4 teve uma expressão semelhante em ambas as idades avaliadas, com uma maior porcentagem de células positivas no 15º dia 22,45% adultos e 18,21% pré-púberes; não mostrou diferença estatística entre as idades avaliadas ($p > 0,05$) (Figura 34).

A análise de citometria em cães adultos revelou que GFRA1 e OCT4 tem expressão semelhante com 0 dias GFRA1=14,37% e OCT4=14,40%, sugerindo elevada porcentagem de células tronco espermatogônias. As células positivas para OCT4 aumentaram no 15º dia 22,06%, diferentemente GFRA1 que diminui sua expressão tendo em média 8,14% de células positivas. Estes dados, mostram que as espermatogônias estão em processo de diferenciação e autorrenovação *in vitro*, e que estas células mantêm suas atividades no processo espermatogênico mesmo em um nicho celular diferente do *in vivo*.

Em cães pré-púberes o marcador PLZF foi expresso no 10º dia (22,17%), e mostrou uma menor expressão no 15º dia 8,02% nas SSCs caninas. Quando analisamos a expressão PLZF nas células germinativas dos cães adultos, as células apresentaram uma tendência aumentar a expressão no 15º dia de cultivo, de acordo com análise estatística ($p > 0,05$) (Figura 33 D).

Ao comparar a expressão nas células germinativas dos cães pré-púberes com os adultos, estas células apresentaram uma menor porcentagem de células positivas para PLZF no 5º dia de cultivo, em média 7,23% em pré-púberes e 23,23% em adultos (Figura 34). Contudo, nos demais dias avaliados esta proteína teve semelhante expressão em ambas as idades reprodutivas, com maior porcentagem de células positivas no 10º dia (22,17% pré-púberes e 20,48% adultos). As avaliações mostraram uma tendência a diminuir a porcentagem de células positivas no 15º dia de cultivo 8,02% pré-púberes e 9,79% adultos (Figura 34). Este marcador não mostrou diferença estatística entre as idades avaliadas ($p > 0,05$).

A expressão de C-kit (CD117) demonstrou diferença na porcentagem de células positivas nos animais pré-púberes, quando comparamos os dias 0 e 15 ($P = 0,0371$), 5 e 15 ($p = 0,0098$) e 10 e 15 ($p = 0,0496$) de cultivo, mostrando uma expressão elevada no 15º dia (Figura 33 D). Em adultos, observamos nos dias 0 - 9,43% e 5º - 10,33%, uma elevada expressão de C-kit. No 10º dia as células dos cães adultos, tiveram uma diminuição da porcentagem de células positivas para esta proteína 1,72 %, seguido por um aumento no dia 15 - 8,65%, bem próximo aos dias iniciais do cultivo. Comparando os dias de cultivo e a porcentagem de células positivas em relação a idade dos animais, notamos que a presença células positivas para C-kit em pré-púberes e adultos foi estatisticamente diferente entre o 10º ($p = 0,0249$) e 15º dia de cultivo ($p = 0,0495$) (Figura 33D e 5). Portanto, estes resultados demonstraram que as células germinativas dos animais pré-púberes *in vitro* tende a diferenciar no 15º dia de cultivo, e as células dos animais adultos apresentam estas características fenotípicas no início do cultivo celular, revelando que neste período *in vitro* temos uma população mais heterogênea, composta de células diferenciadas e indiferenciadas.

O marcador DAZL nas células germinativas dos cães pré-púberes apresentou no período entre 0 e 5º dia de cultivo a média de células positivas semelhantes. No 10º dia - 13,41% das células eram positivas e atingindo o ponto máximo da expressão no 15º dia. Diferentemente, as células germinativas dos cães adultos não tiveram uma expressão estável, observou-se um aumento no 5º dia de cultivo, 10,33%, seguida por uma diminuição no 10º dia - 1,72% (Figura 33D). Estes dados resultaram em uma diferença estatística na expressão de DAZL nas células germinativas entre as diferentes idades reprodutivas, evidenciadas nos dias 10 - $p = 0,0223$ e 15 - $p = 0,0439$ de cultivo (Figura 34).

A proteína STRA8 em cães pré-púberes foi expressa em todos os períodos analisados e manteve sua expressão nos dias 0 - 14,67% e 15 - 15,56% de cultivo, revelando que neste período temos uma alta porcentagem de células espermatogônias. Em cães adultos, a porcentagem destas células aumentou com o tempo de cultura; nos dias 0 e 5 observamos em

média 14,07% de células positivas e no dia 15 - 21,73% foram positivas para este marcador., porém a análise estatística não mostrou diferença significativa (Figuras 33D e 34).

A análise de citometria de fluxo revelou a expressão das proteínas nas células germinativas *in vitro* durante as diferentes idades reprodutivas e dias de cultivo, destacando que as células germinativas caninas conseguem se autorrenovar por 15 dias *in vitro*. Sendo assim, nossos estudos sugerem um aumento de SSCs em autorrenovação após 10 dias de cultivo nos animais pré-púberes e aos 15º dias de cultivo nos adultos. Neste período observamos em média 19,67% e 22,17% de células positivas para OCT4 e PLZF em pré-púberes, e 22,45% e 9,79% SSCs positivas nos cães adulto, embora não foi possível ter uma população homogeneia (Figuras 33D e 34).

Figura 33 - Caracterização das SSCs caninas em cultura nos dias 0, 5, 10 e 15 dias de cultivo

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: (A) e (C) células germinativas marcadas com GFRA1, PLZF e STRA8, nos testículos de cães pré-púberes e adultos. (A) SSCs marcadas com GFRA1, (B) marcador nuclear de SSCs, PLZF em pré-púberes e adultos (C) STRA8 expresso em células germinativas. (D) Gráficos destacando expressão de C-kit, DAZL, GFRA1, OCT4, PLZF e STRA8 para análise de citometria de fluxo das SSCs caninas com 0, 5, 10 e 15 dias em cultivo. Obejtiva 200x. Análise estatística da média da porcentagem de células positivas em diferentes dias de cultivo (* p < 0,05).

Figura 34 - Análise de Citometria de fluxo da expressão dos marcadores GFRA1, DAZL, OCT4, PLZF, C-kit, STRA8 de SSCs caninas em diferentes idades reprodutivas (pré-púberes e adultos) e tempo de cultivo

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Legenda: **(A)** Histograma das SSCs em cultivo. **(B)** Gráfico comparando a expressão dos marcadores GRA1, DAZL, PLZF, C-kit (CD117), STRA8 e OCT4 com 0, 5, 10 e 15 dias de cultura em testículos caninos pré-púberes e adultos.

6.3.4 Discussão e Conclusão

Marcadores de células germinativas têm sido estudados em diferentes espécies de animais domésticos (PARK et al., 2012; VANSANDT et al., 2012; HARKEY et al., 2013; TIPTANAVATTANA et al., 2013; LEE et al., 2014), para o melhor entendimento da função biológica das células tronco germinativas e para identificar o nicho destas células, possibilidade o êxito da aplicação no tratamento de infertilidade. No presente estudo, investigamos as características imunofenotípicas das células germinativas caninas utilizando os marcadores PLZF, DAZL, GFRA1, C-kit, STRA8 e OCT4 no testículo de cães em

diferentes idades reprodutivas e a relação entre esses marcadores com os diferentes dias de cultivo.

Harkey et al. (2013) descreveram que em culturas iniciais de espermatogônias, observa-se muitas células aderidas ao substrato, as quais são importantes para manutenção das espermatogônias *in vitro*. Morfologicamente, as espermatogônias apresentam-se relativamente arredondada, menos aderentes e formam um aglomerado celular sobre a camada fibroblástica confluyente após 8 dias de cultivo, bem como relatado em nosso estudo, no qual as células germinativas de cães pré-púberes e adultos apresentam as mesmas características morfológicas das espermatogônias *in vitro*, e a expressão de marcadores específicos para as células germinativas como GFRA1, PLZF e STRA8, assim como mencionado pelos autores supracitados, o qual observaram que aglomerados celulares com morfologia semelhante, expressavam vários marcadores de espermatogônias, incluindo DAZL, UCHL1, e AP180, bem como VASA.

De acordo com a literatura, em animais domésticos GFRA1 é um marcador importante para gonócitos e SSCs (MAKI et al., 2009; REDING et al., 2010; ABBASI et al., 2013; LEE et al., 2013; ZHENG et al., 2014), além de ser um receptor de membrana frequentemente utilizados em animais domésticos: como gatos (VANSANDT et al., 2012), roedores (SARIOLA 2008; 2013; TIPTANAVATTANA et al., 2013), equinos (COSTA et al., 2012); suínos (KUIJK et al., 2009; LEE et al., 2013) e catetos (CAMPUS-JUNIOR et al., 2012). He et al. (2010) descreveram que no testículo humano adulto, GFRA1 está presente apenas em espermatogônia e não em outras células germinativas diferenciadas. Diferentemente, dos nossos achados que por análise de imuno-histoquímica revelou a expressão de GFRA1 em espermatogônias no testículo de cães pré-púberes, mas em púberes e adultos notou-se a expressão em espermátides arredondas.

Em testículo canino observamos na fase reprodutiva pré-púberes apenas espermatogônias e células de Sertoli nos túbulos seminíferos, como também demonstrado por outros autores (HARKEY et al., 2013). Os autores sugerem, que nesta fase todas as células espermatogoniais são SSCs e o processo espermatogênico não foi iniciado citam que as moléculas de superfície como GFRA1, GPR125, ITGA6, ITGB1, e ADN-acetil-galactosamina são importantes para o enriquecimento das espermatogônias por meio da citometria de fluxo, embora os autores não descrevam a expressão de GFRA1 nas células germinativas caninas, por meio de imunohistoquímica e citometria de fluxo. Entretanto, nosso estudo com as células germinativas caninas notamos a expressão de GFRA1 em pré-púberes, púberes e adultos, por meio destas técnicas.

A análise quantitativa, revelou uma elevada prevalência de células espermatogônias que expressão GFRA1 no testículo de cães púberes, bem como em pré-púberes e adultos. No entanto, o valor da porcentagem de células positivas para GFRA1, 5,70%, foi menor que os valores encontrados em outras espécies, como catetos (93%) (CAMPUS-JUNIOR et al., 2012) e camundongos (90%) (GRISANTI et al., 2009). Em filhotes de camundongos cerca de 8% da suspensão de células pré-classificadas no 10º dia de cultivo são positivas para GFRA1 e da fração classificadas pelo sorting apenas 2% das células são positivas (BUAGEAW et al., 2005). Estudando as células germinativas caninas na fase pré-púberes por citometria de fluxo aos 10 dias de cultivo encontramos que em média, 1,31% das células foram positivas para esta proteína e a análise de imuno-histoquímica mostrou que apenas 1.067 células são positivas para GFRA1 nos túbulos seminíferos. Este resultado pode indicar um menor reconhecimento epítipo-anticorpo ou baixo nível de expressão epítipo GFRA1 nas células positivas (BUAGEAW et al., 2005).

Em filhotes de camundongos, Buageaw et al. (2005) mostrou que a imunoreatividade do OCT4 é de 15 vezes maior em uma pequena população de células testiculares recuperadas de uma fração de sorting positivas para GFRA1. Estas observações de acordo com os autores, levantam a possibilidade da expressão destes dois marcadores nas SSCs pós-natal, confirmando a existência de uma população de células heterogênicas. No mesmo período, em cães a população de células germinativas foi de 21,27% positiva para OCT4 e para GFRA1, seguidamente foi observado uma diminuição da porcentagem de células com o tempo de cultivo (2,62%), no entanto, não foi analisado estes marcadores na mesma célula como uma dupla marcação.

De acordo com estudos realizados com testículo de camundongos pós-natal (COSTOYA et al., 2004), a expressão da proteína atinge um pico na sua expressão na idade de uma semana de vida e é localizada em gonócitos e espermatogônias. Nesta fase do desenvolvimento, a expressão de PLZF é alta em gonócitos e diminuiu ao longo do tempo. Buaas et al. (2004) descreveram que esta proteína está envolvida no desenvolvimento de células germinativas masculinas e na regulação do estado epigenética das células indiferenciadas podendo manter as células num estado indiferenciado. Em nosso estudo com SSCs nos testículos caninos, o PLZF foi expresso em espermatogônias, como mencionado por outros autores (BUASS et al., 2004), sendo presente nos túbulos seminíferos dos cães pré-púberes, púberes e adultos.

De acordo com Costa et al. (2010), no testículo de equinos adultos, aproximadamente 80 a 90% das espermatogônias (Aund) expressam PLZF. Diferentemente, no testículo de cães

adulto, o PLZF foi expresso no núcleo de espermatogônias tipo A e intermediária, sendo em média 2,86-23,23% das células positivas, corroborando com o encontrado por Cheng e Liu (2015), em um artigo de revisão, que mostrou a expressão deste marcador em todas as espermatogônias indiferenciadas em todas as fases reprodutivas. Hobbs et al. (2012; 2010) descreveram que o PLZF é um marcador para células espermatogônias progenitoras, mas também é detectado em espermatogônias no estágio inicial do processo de diferenciação.

Em um estudo com camundongos jovens e adultos, a expressão de PLZF foi detectada no testículo dos animais jovens, com diferentes níveis de expressão PLZF (RYU et al., 2007; FERDER; WANG, 2015). Os autores citam que algumas destas espermatogônias possam perder sua capacidade de repovar o testículo com o avançar da idade. Nos testículos caninos avaliados, análise de imunohistoquímica revelou que maior expressão de PLZF foi em espermatogônias dos animais pré-púberes e adulto.

Nos mamíferos, o OCT4 é importante para manter as células indiferenciadas, além de ser um importante regulador da diferenciação de células germinativas (PESCE et al., 1999). Em camundongos e humanos o OCT4 foi usado como marcador para células tronco germinativas, revelando uma expressão específica nas células indiferenciadas e em células tronco espermatogoniais no testículo adulto (PESCE et al., 1998; OHBO et al., 2003; BHARTIYA et al., 2010; IZADYAR et al., 2011). Os resultados de citometria de fluxo mostraram a expressão de OCT4 nas células germinativas caninas na fase pré-púberes e adultos e um aumento de células positivas ao longo do tempo de cultura, diferentes dos outros estudos que demonstraram apenas células positivas na idade fetal (HE et al., 2010). No entanto, Mahla et al. (2002) mostrou a expressão desta proteína nos testículos de buffalos s pré-púberes e adulto, assim como encontramos nas células germinativas caninas.

Filipponi et al. (2007) afirmam que a função de autorrenovação é mantida nas espermatogônias e as mutações no gene C-kit podem provocar deficiências no desenvolvimento de células germinativas (LOVELAND; SCHLATT, 1997). Em células germinativas caninas, observamos na citometria de fluxo maior porcentagem de células C-kitkit positivas no testículo de cães pré-púberes no 15º (19,53%) dia de cultivo, de modo diferente dos descrito em humanos, o qual 13% das células foram positivas para este marcador (IZADYAR et al., 2011). C-kit em ratos adultos é expresso em espermatogônias diferenciadas, mas não em células tronco espermatogoniais (ROSSI et al., 2000; OHTA et al., 2000). As células germinativas positivas para C-kit em cães adultos mantiveram um aumento no 10º dia de cultivo e em seguida esta diminui sua expressão, evidenciando o final do processo de diferenciação.

Lee et al. (2014) investigaram nove anticorpos conhecidos de espermatogônias em mamíferos durante o desenvolvimento do testículo canino aos 2, 3 e 12 meses de idade, por imuno-histoquímica; entretanto, os autores demonstraram a expressão de apenas PGP9.5 em espermatogônias e DAZL em espermátócito. Diferentemente, no testículo dos cães avaliados neste estudo, encontramos a expressão em espermatogônias e espermátócitos. Murta et al. (2013) também mostrou a expressão do DAZL no testículo de camundongos com 4 dias de idade. Em cabra, o DAZL pode ser detectada em 30, 50, 90 dias após o nascimento nos testículos adultos (NIU et al., 2014). Os autores citam que expressão de DAZL no testículo adulto é significativamente maior do que no testículo jovem, nos cães a expressão desta proteína teve diferença estatística quando comparamos as células de cães pré-púberes e adultos *in vitro*.

A análise imuno-histoquímica mostrou no testículo de cães púberes e em adultos a expressão de DAZL na membrana de espermatogônias tipo A; B e espermátócito, bem como, Park et al. (2014) detectou expressão em células germinativas pré-meiótica de suínos e em rato (RUGGI et al., 1997). Ruggiu et al. (1997) citam que o DAZL é uma proteína específica de células germinativas, este é amplamente utilizado em mamíferos. Mas, de acordo com Jung et al. (2014) mais estudos são necessários para identificar a função de DAZL na sobrevivência e desenvolvimento das células germinativas.

Em cães observamos a presença de DAZL em espermatogônias indiferenciadas, como descrito por outros autores em camundongos (HAO et al., 2008) em cavalo na fase púberes (JUNG et al., 2014), e em humanos (REJO et al., 2000). Em cães observamos a expressão desta proteína no citoplasma das espermatogônias dentro de túbulos seminíferos, sendo em adultos imunolocalizado em espermatogônias na membrana basal ou próximas a membrana. Os autores supracitados sugerem que DAZL pode ser utilizado como um marcador para a diferenciação entre espermatogônia indiferenciada e diferenciada neste estágio do desenvolvimento e outros autores afirmaram que DAZL participa da fase inicial do desenvolvimento reprodutivo.

Estudos têm demonstrado que STRA8 e DAZL são essenciais durante a espermatogênese. STRA8 é importante para codificar uma proteína necessária para a replicação do DNA pré-meiose após a entrada em prófase I (FENG et al., 2014), pesquisas em camundongos, mostraram que o gene *Stra8* está ligado a fertilidade, e é expresso em espermatogônia e espermátócitos, mas não é possível distinguir entre diferentes subtipos de espermatogônias (SCHRANS-STASSEN et al., 2001; BALTUS et al., 2006; ANDERSON et al., 2008; MARK et al., 2008; ZHOU et al., 2008). End et al. (2015) em um modelo

experimental afirmou que Stra8 deve ser expresso antes ou durante a diferenciação espermatogonial e conclui que subconjunto de espermatogônias (indiferenciadas) que são PLZF-positiva, também expressam Stra8 e GFRA1. Estes autores hipotetizam que a expressão Stra8 começa imediatamente antes da diferenciação espermatogonial. Nos testículos caninos avaliados, observamos a localização de proteínas STRA8 no núcleo de espermatogônias e espermatócitos no túbulo seminífero nas idades pré-púberes e adultos.

Esta proteína mantém a expressão em células germinativas caninas na fase pré-pubere *in vitro*, sendo em média 15% de células positivas, mas nas células dos cães adultos, a porcentagem de células positivas aumentou com o tempo de cultivo. Para End et al. (2015), o Stra8 é considerado um candidato a regulação de espermatogônias no processo de diferenciação, os autores sugerem que esta proteína *in vitro* com adição de ATRA pode atuar diretamente sobre espermatogônia iniciais aumentando a expressão de STRA8 (ZHOU et al., 2008).

Em conclusão, nossos dados demonstraram que as células germinativas do testículo canino têm imunocompatibilidade com PLZF, GFRA1, OCT4, C-kit, STRA8 e DAZL. Portanto, estes marcadores podem ser utilizados para identificar as células germinativas caninas em diferentes fases do desenvolvimento reprodutivo, bem como avaliar o processo espermatogênico. Cerca de 15 a 22% de células germinativas expressam OCT4 indicando a presença de uma população de SSCs com características pluripotentes nos testículos de cães pré-púberes e adultos, sugerindo a presença de células com potencial de autorrenovação para se manter por um longo período *in vitro*. Além disso, a técnica de imuno-histoquímica revelou que GFRA1, DAZL, PLZF são expressos em células tronco espermatogônias em todas as faixas etárias avaliadas, demonstrando que estas proteínas participam do desenvolvimento inicial reprodutivo e mantêm-se na por todo o processo espermatogênico.

Capítulo 4- (Experimento 4) - –
Análise da adição de FSH *in vitro* das SSCs caninas

6.4 EXPERIMENTO 4 - ANÁLISE DA ADIÇÃO DE FSH *IN VITRO* NAS SSCs CANINAS

6.4.1 Delineamento Experimental

Para avaliar o efeito do hormônio FSH nas células germinativas de cães pré-púberes *in vitro*, utilizou-se as técnicas de imunofluorescência por meio da citometria de fluxo e da expressão gênica do gene *GFRA1*. Este tratamento foi empregado nas células germinativas com intuito de promover um microambiente mais próximo do *in vivo* e assim obter o repovoamento dos túbulos seminíferos dos camundongos receptores após o transplante e o sucesso do xenotransplante entre estas espécies com a produção de espermatozoides caninos (Figura 35).

Figura 35 - Delineamento experimental

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

6.4.2 Material e Métodos

6.4.2.1 Coleta das Amostras

A população de células tronco espermatogoniais (SSCs) foram obtidas dos testículos de cães pré-púberes (<3-6 meses), sendo cultivadas como descrito anteriormente no experimento- 6.2 EXPERIMENTO 2- Caracterização das células tronco espermatogonial (SSCs), item: 6.2.2.2 Cultivo das espermatogoniais caninas

As células foram cultivadas em meio DEMEN F12 (Cat #BR-30004-05, LGC, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Cat#12657029, Gibco, invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 6mM de L-Glutamine (Cat#25030-081, invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,5mM de Piruvato (11360-070, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), 10.000 U/ml de Penicilina e Espectromicina (Cat#15140-122, thermo scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 100 U / L de anfotericina B (Cat# A2942, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) a 38°C em 5% de CO₂, nesta etapa não realizamos o plaqueamento diferencial. Após dois dias de cultivo as células somáticas estavam presentes na placa, assim iniciou-se a adição de FSH no meio de cultivo.

O hormônio folículo estimulante (FSH, Cat#4021, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) foi adicionado no cultivo das células espermatogônias co-cultivadas com as células somáticas, na concentração de 10IU L⁻¹, com mudança de meio de cultivo e hormônio a cada dois dias, durante 5 dias (ANJAMROOZ et al., 2009). As células foram mantidas com e sem a adição de FSH e posteriormente avaliamos a influência do FSH nas células por meio de RT-PCR e por citometria de fluxo nos períodos de 72 e 120 horas.

6.4.2.2 Imunofluorescência

A análise de imunofluorescência por citometria de fluxo foi realizada com as células germinativas caninas coletadas após 72 e 120 horas de tratamento com adição de FSH *in vitro*. Também avaliamos as células dos mesmos animais sem o tratamento de FSH nos dois períodos supracitados. Um total de 8×10^4 espermatogônias foram utilizadas para cada

anticorpo. As células foram lavadas em PBS com 1% BSA (Cat#A2153, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), em seguida incubou-se durante 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo anti-GFRA1 (1: 100; sc10716, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). Posteriormente as células foram lavadas com PBS com 1% BSA e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário Goat anti-rabbit (H+L) Alexa 488 (1: 300; Cat #: A-11034, Invitrogen, Calsbad, CA, EUA). As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e pelo software 4 FCS express 5 Plus.

Realizamos a análise estatísticas da porcentagem de células positivas para GFRA1, com e sem o tratamento de FSH nos períodos de 72 e 120 horas das células *in vitro*. Para isto, foi utilizado o teste ANOVA (two-way) no software Graph Prism 5.

6.4.2.3 Expressão gênica das células tratadas e não tratadas com FSH *in vitro*

Após 72 e 120 horas de cultivo as células foram avaliadas quanto a expressão do gene *GFRA1* por RT-PCR (Quadro 2). O RNA total foi extraído com Trizol® (Cat# 15596-018, Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo a seguir (BREISSAN et al., 2013) e como descrito no **Experimento 1- Diferenciação das células germinativas embrionárias caninas (EGCs) -Expressão gênica- Caninas (EGCs) diferenciadas com All-trans retinóico *in vitro*.**

Quadro 2 - Sequência de Primers de Cães (*Canis Lupus Familiares*) para análise de PCR

Gene	ID Gene	Sequencia (5' - 3')	Tamanho (pb)
<i>GFRA1</i>	XM_846994.3	F:5'GCAAGTGGAGCACATTCCCA 3' R:5'CAGACCTCGTTGGACATGCT3'	58
<i>18S</i>		F: 5'CCTGCGGCTTAATTGACTG 3' R: 5'CTGTCAATCCTGTCCGTGTC 3'	187

Após o processo de extração de RNA e síntese de cDNA, este foi quantificado no espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA) com a finalidade de normalizar as reações de síntese de cDNA. Após a extração, o cDNA foi sintetizado com o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Cat#4368814, Life Technologies, Carlsbad, CA) seguindo as recomendações do

fabricante. O PCR foi realizado utilizando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). O tecido testicular de cão adulto foi utilizado como controle positivo da reação.

Empregamos o modelo de quantificação relativa com correções pela eficiência do primer, e os dados subministrados pelo software do equipamento StepOne Plus® Applied Biosystem. (Step one software versão 2.3). Cada reação teve o volume de 10µl.. Os dados foram analisados com o programa LinReg PCR (Versão 2015.0) e a expressão do gene *GFRA1* foi normalizada pela expressão do endógeno *18S*, empregando a metodologia de correção de eficiência da equação de Pfaffl.

Para garantir a confiabilidade dos resultados de expressão gênica, seguiu-se o protocolo modificado descrito por FRANÇA (2012), conforme descrito no ***Experimento 1-Diferenciação das células embrionárias caninas (EGCs)-6.1.2.3.2. Desenho do primer e Validação*** (Figura 36).

Figura 36 - Esquema da validação do primer

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016)

Legenda: Ilustração dos procedimentos adotados para validação do primer *GFRA1* de cão.

6.4.3 Resultados

Na análise estatística das amostras de citometria de fluxo, comparamos os grupos tratados com FSH e não tratados nos períodos de 72 e 120 horas, e este revelou que o tempo

de cultivo não tem o mesmo efeito nas células tratadas e não tratadas com FSH, como destacado na análise estatística. Com isto, observamos que o tempo de exposição das células germinativas caninas ao FSH *in vitro*, influencia a porcentagem de células positivas para GFRA1 ($p=0.0170$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Comparação da expressão de *GFRA1* com e sem tratamento FSH *in vitro*

Fonte: (PIERI, N.C.G.,2016).

Legenda: Avaliação da média na expressão GFRA1 nas células germinativas após a adição de FSH *in vitro* e sem adição de FSH. Após os períodos 72 e 120 horas ($p>0,05$).

Entretanto, quando comparamos a influência do tratamento com FSH nas células germinativas caninas que expressavam GFRA1 com o tempo (72/120h), por meio do teste t pareado com 95% de confiabilidade, destacamos que não houve diferença estatística entre as médias (0,142) da porcentagem de células positivas nos dois períodos ($p=0,73$), bem como não encontramos diferença estatística, quando comparamos as médias (1,8) da porcentagem das SSCs positivas para GFRA1 sem o tratamento de FSH ($p=0,42$) nos dois períodos avaliados. Isto mostra, que o tempo de 72 e 120 horas não é o suficiente para a autorrenovação das SSCs caninas, uma vez que GFRA1 é um fator ligado diretamente a autorrenovação *in vitro*.

Por fim, comparamos a influência do tratamento na expressão GFRA1 sem o fator tempo, realizamos o teste t não pareado (Mann whitney) com 95% de confiabilidade, detectamos a diferença entre as médias do grupo de células tratadas e não tratadas com FSH e estas apresentam diferença estatística ($p=0,0176$). Sendo em média 3.32 ± 0.9765 células positivas para GFRA1 com o tratamento e $1,2 \pm 1.044$ sem o tratamento, este dado demonstram

que o tratamento com FSH *in vitro*, aumenta o número de células positivas para GFRA1, o qual é expresso por células espermatogônias, sendo assim, este auxilia na autorrenovação e manutenção destas células (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Comparação da expressão de GFRA1 com e sem tratamento FSH *in vitro*

Fonte: (PIERI, N.C.G.,2016).

Legenda: Avaliação da média da porcentagem de células germinativas positivas GFRA1 com e sem o tratamento de FSH *in vitro* ($p > 0,05$).

A análise de RT-PCR foi realizada para comprovar os dados demonstrados pela análise de imunofluorescência por citometria de fluxo. A expressão de *GFRA1* foi detectada em todas as amostras avaliadas, entretanto a expressão deste gene teve um aumento de 5x nas células tratadas com FSH *in vitro* em relação a células não tratadas no período de 120 horas. Estes dados mostram que neste período, pode ocorrer um aumento na proporção de células espermatogônias influenciada pelo FSH, as quais estão entrando em rápida proliferação e diferenciação para se autorrenovar e manter-se em cultivo.

Ao avaliarmos as células germinativas caninas não tratadas, estas apresentaram uma discreta tendência a aumentar a expressão do gene *GFRA1* com 120 horas de cultivo, e seguidamente diminui sua expressão como nas células tratadas com FSH. Este resultado mostrou, que no período de 120 horas as SSCs em cultivo, ocorre um processo de autorrenovação e proliferação independente do tratamento com FSH. Entretanto quando se adiciona o FSH *in vitro*, o qual está ligado as células de Sertoli, que irá ativar o gene *GFRA1* responsável por este processo de autorrenovação, ocorre um aumento no número de células que conseguem entrar neste processo (Gráfico 5).

Assim, confirmamos por meio das técnicas de citometria de fluxo e qPCR, que o período de 120 horas após adição de FSH ocorre um maior número de SSCs em proliferação e em processo de autorrenovação, ou seja, este seria o tempo ideal para injeção destas células *in*

vivo, uma vez que temos a influência hormonal do FSH ligado a ativação do gene *GFRA1* nas SSCs, promovendo um aumento na taxa de células tronco espermatoγονial *in vitro*.

Gráfico 5 - Expressão gênica do *GFRA1* em diferentes tempos de cultivo após o tratamento com FSH

Fonte: (PIERI, N.C.G.,2016).

Legenda: Avaliação da expressão do gene *GRA1* nas células germinativas, após a adição de FSH (FSH) e sem FSH (ST). Após os períodos de 72 e 120 horas e 10 dias.

6.4.4 Discussão e Conclusão

A indução e manutenção da espermatogênese depende da interação contínua e controlada de várias hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. No período da puberdade o FSH induz a espermatogênese, por meio das células de Sertoli que possuem receptores para este hormônio. Embora, sejabem estabelecido na literatura está ligação com as células de Sertoli (CHEMES et al., 1979; ALMIRON et al., 1984; NIKLOWITZ et al., 1989; SINHA HIKIM et al., 1991) existe algumas evidências de que o FSH pode também se ligar diretamente as espermatogônias (ORTH; CHRISTENSEN, 1978). Por esta razão, este estudo com SSCs caninas de animais pré-púberes co-cultivadas com outros fatores foi realizado para entendermos a influência do FSH nestas células, seu papel na espermatogênese e avaliar se o tratamento com o hormônio FSH nas células SSCs *in vitro* proporciona um ambiente fisiologicamente mais relevante para o estudo biológico e o sucesso do transplante destas células.

As células germinativas caninas foram tratadas com FSH *in vitro* e revelaram uma diferença na expressão de genes importantes ligados ao FSH, quando comparamos com as

células não tratadas. Isto pode estar ligado ao fato do FSH ser importante na espermatogênese, principalmente por controlar o nicho das SSCs e criar um ambiente adequado para os complexos evento de proliferação de diferenciação (ROSSI; DOLCI, 2013).

Neste estudo desenvolvemos um método de cultivar as SSCs conjuntamente com as células somáticas, o qual possibilita manter as SSCs *in vitro* por 10 dias com atividade de autorrenovação e proliferação celular. Estudo semelhante foi relatado por Ma'kela et al. (2014) com células germinativas de camundongos, o qual descreveram que as vantagens deste método é que não há técnicas de isolamento e não são necessários dispositivos especiais para a separação de células, também nenhum fator de crescimento exógeno é necessário e pode ser estabelecido com um meio básico de cultivo.

Ding et al. (2011) para identificar mais o efeito do FSH sobre a proliferação de espermatogônia em camundongos, realizaram o co-cultivo de espermatogônias tipo A com células de Sertoli em meio isento de soro. Os autores citam que quando adicionado 20 ng/mL de rFSH ao meio/dia, o número total de espermatogônia detectada por citometria era significativamente mais elevada após 7 dias *in vitro*, devido a maior expressão de Nr77 e GDNF. Após 14 dias, as espermatogônia cultivadas na presença de rFSH proliferam rapidamente e as espermatogônia cultivadas na ausência de rFSH proliferaram lentamente. Em cães a análise de citometria revelou que o tratamento com FSH *in vitro*, promoveu aumento do número de células positivas para GFRA1, o qual é expresso por células espermatogônias, auxiliando na autorrenovação e manutenção destas células. Embora quando comparamos a expressão deste fator em diferentes tempos de cultivo, não houve diferença estatística.

Meng et al. (2000) citam que uma das propriedades específicas das SSCs que as diferenciam das espermatogônias diferenciadas é a expressão do glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) Family receptor alpha1 (GFRA1), o qual requer sinalização em resposta as células de Sertoli derivadas do GDNF (VIGLIETO et al., 2000; YOMOGIDA et al., 2003; KUBOTA et al., 2004). Seguindo este preceito, em nosso estudo mantivemos as SSCs caninas sobre uma camada de célula somáticas para criar o microambiente *in vitro* o mais próximo do *in vivo*.

As SSCs caninas em co-cultivo com as células somáticas permitem que estas células respondam a estímulos fisiológicos. O tratamento por 120 horas com FSH, mostrou que o tempo de exposição das células germinativas caninas a este hormônio, influência na expressão do gene *GFRA1*. Ma'kela et al. (2014) também verificou que o tratamento de FSH em co-

cultura de células de Sertoli de camundongos, afeta secundariamente os níveis estáveis de alguns mRNAs associados a espermatogônias, mais claramente as de *Gfra1* e *Stra8*.

Portanto, as células germinativas caninas tratadas com FSH apresentam um aumento na expressão do gene *GFRA1* quando comparamos com o grupo não tratado. Ma`kela`et al. (2014) citam que mudança induzidas pelo FSH ativa nas SSCs de camundongos a expressão mRNA *GFRA1*. Diferentemente Anjamrooz et al. (2006) avaliou o número de colônias formadas em cultivo quando as células germinativas eram suplementadas com FSH e este não mostrou qualquer diferença entre o grupo controle. Como em nosso estudo com as SSCs caninas, que apresentam uma tendência a elevar a expressão do mRNA *GFRA1* após 120 horas de cultivo, independente da influência do FSH. Este processo pode ter sido induzido pelos fatores de crescimento secretado pelas células de Sertoli que influencia as espermatogônias (ANJAMROOZ et al., 2006).

O mecanismo específico de FSH que atua em espermatogônias ainda não está claro, os estudos de Böckers et al. (1996) indicam que apenas as células de Sertoli são alvo do FSH, e o efeito sobre espermatogônias é provavelmente mediada por elas. Na verdade, é cada vez mais evidências de que as células de Sertoli produzem fatores mitogênicos que sobre o controle do FSH agem nas espermatogônias (KANCHEVA et al., 1990; TAJIMA et al., 1991). Este fator por responder aos nossos achados o qual há um aumento no número de células GFRA1 positivas com adição de FSH *in vitro*, sendo o GFRA1 uma proteína encontrada apenas em células espermatogoniais em caninos pré-púberes.

As respostas celulares ao GDNF são mediadas por um complexo receptor multicomponentes consistindo de receptor de RET tirosina cinase e uma glicosil-fosfatidilinositol ligada subunidade de ligação GFRA1 (TOMAC et al., 2000). GFRA1 foi detectada na população de espermatogônias em numerosas espécies de mamíferos tais como roedores (DETTIN, 2003; SATO et al., 2011; GASSEI; ORWING, 2013) porcos (KUIJK et al., 2010), cavalos (COSTA et al., 2012) macaco rhesus, (GASSEI et al., 2010) e seres humanos (HE et al., 2010). Embora, alguns autores mencionam que a fração de células GFRA1 +, são ligeiramente enriquecidas para SSCs nos testículos neonatal (BUAGEAW et al., 2005; EBATA et al., 2005; OATLEY; BRISTER, 2008). Portanto, sugerimos que a população de célula que sofre um aumento com adição de FSH em cultivo de células germinativa canina são SSCs nos cães pré-púberes.

De acordo com vários estudos o FSH regula a espermatogênese por meio das células de Sertoli, o qual promove a proliferação das espermatogônias nos mamíferos (SHETTY et al., 1996) e espécies de peixes (LOIR, 1999; OHTA et al., 2007). *In vitro* o FSH estimula a

expressão de GDNF em células de Sertoli (SIMON et al., 2007; TADOKORO et al., 2002; DING et al., 2011). As respostas celulares ao GDNF são mediadas por um complexo receptor multicomponentes que consistindo de receptor de RET ligado a subunidades de ligação GFRA1 (TOMAC et al., 200). Nossa pesquisa identificou o perfil do gene expresso *GFRA1* em espermatogônias caninas, o qual é sinalizado por uma via conhecida e pelo seu papel na autor-renovação das SSCs em mamíferos (MENG et al., 2000; KUBOTA et al., 2004; OATLEY; BRINSTER,2012). Concluimos que a adição de FSH *in vitro* promove a proliferação das espermatogônias caninas GFRA1+ e que este, portanto regula o nicho destas células e auxilia na autorrenovação e manutenção pelo período de 120 horas em cultivo, portanto, este seria o período mais indicado para o transplante das células germinativas dos cães pré-púberes nos animais receptores.

Capítulo 5 (Experimento 5) –
Teste agente quimioterápico-Busulfan em camundongos C57BL/6

6.5 EXPERIMENTO 5 - TESTE AGENTE QUIMIOTERÁPICO-BUSULFAN EM CAMUNDONGOS C57BL/6

6.5.1 Delineamento Experimental

Para o sucesso do xenotransplante, primeiramente foi necessário imunossuprimir os camundongos receptores, e para isto utilizamos um fármaco e agente quimioterápico amplamente descrito na literatura o 1,4-Butanediol dimethanesulfonate (Busulfan) (BUCCI; MEISTRICH, 1987; BRINSTER; AVARDOCK, 1994). Segundo estudos consultados este fármaco é dose-dependente e seu efeito varia conforme o tempo de exposição do animal, portanto neste estudo avaliamos a dose de 45mg/kg (dose não letal) deste quimioterápico em dois tempos de exposição, 4 e 6 semanas. Para confirmar a deleção das células germinativas no testículo dos camundongos C57Bl/6, analisamos macro e microscopicamente a espermatogênese, a morfometria dos testículos, imuno-histoquímica (DAZL e PLZF) e parâmetros espermáticos (Figura 37).

Figura 37 - Delineamento experimental

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

6.5.2 Material e Método

6.5.2.1 Ensaio funcional do tempo de ação do Busulfan na espermatogênese em camundongos C57Bl/6

Para o teste quimioterápico utilizamos o farmaco Busulfan (1,4-Butanediol dimethanesulfonate) (Cat#B2635, Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA) pois segundo a literatura consultada o efeito na espermatogênese endógena pode ser controlado pela dose da droga, bem como a fácil administração do tratamento.

Utilizamos 20 camundongos machos C57BL/6 com 5-6 semanas de idade, oriundos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP, mantidos sobre temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (12h de luz, 12h de escuro) e comida e água *ad libitum*.

Os camundongos foram pesados e receberam única injeção intraperitoneal de Busulfan (Cat#B2635, Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA), o qual foi primeiro dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Cat# C6164, Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA) e em seguida o volume equivalente em água destilada estéril foi adicionado para fornecer uma concentração final de 3,8-4,0mg/ml de acordo com o protocolo de Owaga et al. (1997).

Os animais receberam a dose de 45mg/kg por peso corporal e foram divididos em dois grupos: **G1** - não tratados; 10 animais receberam uma única injeção intraperitoneal contendo água estéril e DMSO; e no **G2**-10 animais receberam a dose de 45mg/ml do farmaco por via intraperitoneal. E após o período de 4 e 6 semanas da injeção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ (BUCCI; MEISTRICH, 1987; BRINSTER; AVARDOCK, 1994).

6.5.2.2 Avaliação Macro e Microscópica da Espermatogênese

Os testículos dos camundongos foram coletados, dissecados e pesados após a remoção do epidídimo e posteriormente foram fixados em solução de paraformol 10% por 24 horas. Cada testículo foi desidratado com séries de alcoóis em concentrações crescentes, diafanizado em xilol e incluído em parafina, secções de 4-5µm foram efetuadas e os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para contagem das células germinativas nos túbulos seminíferos.

Para a interpretação dos dados histológicos seguimos as orientações descritas por Banks (1992) e Bacha (2003) e para às estruturas macroscópicas descritas nos resultados utilizamos a Nomina Anatômica Veterinária (1994) e a Nomina Anatômica Veterinária Ilustrada (SHALLER, 1999).

6.5.2.3 Análise Morfométrica dos Testículos

Com a análise histológica dos animais, os túbulos seminíferos em secção transversal foram avaliados em um microscópio com objetiva de 400x, e morfometricamente mensurados, analisamos a densidade tubular (mm²) e diâmetro tubular (µm). A morfologia

tubular e os tipos celulares mais avançados de células germinativas presentes em cada seção transversal do túbulo também foram avaliados, de acordo com Wang et al. (2010).

Desta forma, realizamos as seguintes análises: três não adjacentes seções foram cortadas de amostra de testículo com intervalo de 12µm e coradas com hematoxilina-eosina. As seções foram examinadas em três diferentes observações e 20 túbulos foram mensurados e avaliados por seção, totalizado 60 túbulos por animal, e 300 túbulos por período. Portanto, a análise morfológica dos túbulos seminíferos seguiu os critérios: 1) espermatogênese normal com espermatozoide; 2) espermatogênese parcial sem espermatozoides e 3) túbulos seminíferos anormais. Diferentemente do proposto por Wang et al. (2010), nesta análise usamos um microscópio epifluorescência Zess (Zeiss, Göttingen, Alemanha) com lente de 200x. A imagem digital foi adquirida usando software AxioVision (Zeiss), e analisadas pelo software ImageJ que possibilitou mensurar o diâmetro pela área dos túbulos seminíferos (Tabela 4).

Tabela 4 - Ranking para avaliação da espermatogênese em camundongos tratados e não tratados com Busulfan

Tipos Túbulos Seminíferos	Critérios
Espermatogênese normal	1
Espermatogênese parcial (sem espermatozoides)	2
Túbulo seminífero anormal (Apenas células de Sertoli)	3

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

6.5.2.4 Imunohistoquímica

Para análise imunohistoquímica utilizamos: DAZL e o PLZF para identificar as células germinativas diferenciadas e indiferenciadas (BUAAS et al., 2004; LIN et al., 2008). As amostras de testículos foram inicialmente desidratadas em sequência de alcoóis 70%, 96% e 99%, em seguida permaneceram 20 minutos em Xilol I, 20 minutos em Xilol II e 60 minutos em Xilol III, para a posterior parafinização, seguidamente permaneceram 60 minutos em parafina I, II e III a temperatura de 60°C em estufa. O protocolo para a expressão destas proteínas foi realizado segundo Pieri et al. (2015).

Realizamos a avaliação morfológica qualitativa, por meio da contagem dos túbulos seminíferos positivos para cada proteína, seguindo o protocolo de Hermann et al. (2007) modificado. Os parâmetros foram avaliados uma secção por testículos, e 20 túbulos seminíferos por secção de cada animal, por tanto foram avaliados 100 túbulos seminíferos por período. Para o DAZL levamos em consideração a expressão em espermatogônias diferenciadas e espermátocitos nos túbulos seminíferos avaliados.

6.5.2.5 Avaliação dos Parâmetros Espermáticos

Os epididimos dos camundongos tratados e não tratados com Busulfan foram colocados em 1ml de PBS (pH7.4), cortados em pequenos pedaços e incubados a 37°C por 30 minutos. Analisamos a viabilidade dos espermatozoides pela porcentagem de esperma, excluindo os mortos com 25% de solução de eosina. Portanto, foram adicionados 7µl de solução de eosina em 20µl de células em suspensão após incubação como mencionada anteriormente. A mobilidade dos espermatozoides foi também analisada por porcentagem. E o número de espermatozoides viáveis foi calculado com um hemocítômetro. Estas análises foram realizadas segundo Anjamrooz et al. (2007) e todos os parâmetros espermáticos foram avaliados em um microscópio epifluorescência Zess (Zeiss, Göttingen, Alemanha) com lente de 400x. A imagem digital foi adquirida usando software AxioVision (Zeiss).

6.5.2.6 Análise Estatística

Análise estatística foi realizada com os dados obtidos do tratamento com quimioterápico dos animais e tempos de exposição destes ao fármaco. Os pontos considerados neste estudo foram: peso do testículo (g), diâmetro dos túbulos seminíferos (µm), densidade tubular (/mm²) e os percentuais da análise morfológica. O diâmetro foi mensurado com o programa ImageJ, onde a partir das imagens capturadas efetuamos a medição do diâmetro Feret, que se trata do diâmetro de uma circunferência com mesma área da partícula em questão.

Os dados foram analisados para os efeitos do fármaco nos camundongos nos pontos de tempo (4 e 6 semanas), bem como sua interação, usando ANOVA e o teste *t* não pareado, por meio do software GraphPad Prisma. O coeficiente de correlação foi calculado entre o tempo e cada um dos parâmetros listados anteriormente. Os dados foram expressos com a média $\pm$ SEM ($p>0,05$).

6.5.3 Resultado

6.5.3.1 Análise Histológica - Ensaio Dose/Efeito dos Camundongos Tratados com Busulfan

Analizamos morfologicamente o nível de regeneração espermatogênico dos animais controle e os tratados com 45mg/kg de Busulfan, após 4 e 6 semanas de tratamento, notamos que após 6 semanas, ocorreu a redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e várias alterações morfológicas nas células germinativas.

Comparativamente análise histológica demonstrou que em camundongos com 4 semanas foi detectado a restauração das células germinativas em muitos túbulos, embora alguns destes mostraram desruptura do epitélio germinativo, parede com lúmen limitado, espermatogônias na camada basal e espermatócitos na camada adluminal, espermatídes e espermatozoides no lúmen (Figura 38). Entretanto com 6 semanas, quase não havia células no epitélio germinativo, a maioria dos túbulos apresentavam depleção das espermatídes e espermatozoides, em alguns túbulos sendo possível visualizar uma única camada de espermatogônias, e em outros túbulos apenas células de Sertoli. Análise do interstício revelou áreas com nódulos de hiperplasia das células de Leydig (Figura 38).

Figura 38 - Fotomicrografias dos testículos dos camundongos tratados com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A); (D) e (G) Camundongos de 4 semanas pós tratamento com Busulfan; (D) Túbulos com a presença de espermatozoides (seta), epitélio seminífero (Ep) com células germinativas no ciclo espermatogênico. (G) parede com lúmen limitado (seta grossa), espermatogônias na camada basal (As), espermatócitos na camada adluminal (Es), espermátides e espermatozoides no lúmen (seta), túbulo em degeneração (estrela). (B); (E) e (H) camundongos de 6 semanas, demonstrando a escassez de células do epitélio germinativo, (E) túbulos destacando única camada de espermatogônias (As), (H) Túbulos com única camada de células de Sertoli (Cs). (C); (F) e (I) Grupo Controle, espermatogênese completa, com presença de espermatozoides (seta grossa). Barra: 20μm;1cm.

6.5.3.2 Análise morfométrica das Mudanças nos Testículos dos Camundongos Tratados com Busufan

Todos os animais apresentavam o peso corporal que variou entre 25,75 a 28,2 gramas. A análise morfométrica revelou diminuição da massa testicular do grupo tratado com Busulfan após 6 semanas, quando comparado com o grupo controle e com o grupo tratado com 4 semanas, contudo, verificamos que a massa testicular dos animais tratados nos dois períodos 4 e 6 semanas, exibiam uma diferença significativa entre elas ($p=0,0061$) (Gráfico 6). Os animais com 6 semanas após injeção de Busulfan, revelaram uma diminuição acentuada e

significante da massa testicular ($p < 0,0001$) quando comparado com o grupo de controle (Tabela 5). Entretanto, ao comparamos os animais com 4 semanas e o controle, estes não exibiram diferença estatística entre eles ($p = 0,1328$;) (Gráfico 7).

Tabela 5 - Massa testicular (g), camundongos tratado com Busulfan e não tratados

Camundongos	Peso Testicular (g)			
	4 Semanas (Média±Sem)		6 Semanas (Média±Sem)	
Tratado	0,373	0,076	0,132	0,010
Controle	0,510	0,040	0,253	0,016

Fonte: (PIERI, N.C.G.,2016).

Gráfico 6 - Massa Testicular (g) dos camundongos tratados com Busulfan e controle

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença estatística na massa testicular entres os grupos de camundongos após 4 e 6 semanas de tratamento com Busulfan (* $p > 0,05$).

Gráfico 7 - Massa Testicular (g) dos camundongos tratados com Busulfan e controle

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença na média da massa e desvio padrão entres os grupos de camundongos tratados e controles após 4 e 6 semanas (* $p > 0,05$).

Mensuramos o diâmetro dos túbulos seminíferos nos dois períodos de tempo 4 e 6 semanas, os resultados mostraram que há diferença estatística entre grupos tratados e grupos controle ($p < 0,0001$) (Gráfico 8). Entretanto, ao confrontar os dados grupos observou-se um declínio no diâmetro dos animais tratado com 6 semanas e este com diferença estatística entre eles ($p < 0,0001$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Diâmetro testicular (um) dos camundongos tratados com Busulfan e não tratados

Camundongos	Diâmetro (Mm)			
	4 Semanas (Média ± Sem)		6 Semanas (Média ± Sem)	
Tratados	0,963	0,010	0,868	0,009
Controle	1,287	0,025	1,397	0,014

Fonte: (PIERI, N.C.G.,2016).

Gráfico 8 - Diâmetro Tubular (mm) entre os camundongos tratados com Busulfan e o controle

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença estatística das médias do diametro tubular, nos grupos de camundongos tratados vs controle após 4 e 6 semanas. *Teste t* não pareado. (* $p < 0,05$).

Por fim, determinamos a porcentagem dos três tipos de túbulos seminíferos nas secções histológicas dos grupos controles e tratados Busulfan. De acordo com os resultados, nos dois períodos 18% dos túbulos seminíferos haviam células germinativas, entretanto com 4 semanas encontramos 35,33% dos túbulos com espermatozoide (Tipo1) e, 46% (Tipo 3); diferentemente dos animais tratados com 6 semanas, onde encontramos 18% (Tipo2), e neste período visualizamos o maior número de túbulos anormais 81,67% (Tipo3), com apenas células de Sertoli em sua membrana basal (Figura 39).

Figura 39 - Exame histológico e percentual dos 3 tipos de túbulos seminíferos em seção transversal de testículos de camundongos após tratamento com Busulfan

Fonte: (PEIRI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A), túbulo seminífero normal com presença de espermatozoides- tipo 1; (B), túbulo seminífero normal sem espermatozoides - tipo 2; (C), túbulo seminífero anormal - tipo 3; (D) gráfico do percentual dos tipos de túbulos dos grupos tratados com Busulfan e controle. Barra :20µm.

Todavia, quando confrontamos estes resultados com os animais controle, notamos que mais de 86% dos túbulos seminíferos (Tipo 1) nos animais de 4 e 6 semanas, e estes exibiam uma diferença estatística entre eles ($p=0,0045$). Entretanto, não visualizamos nenhum túbulo seminífero tipo3 (anormal) nos camundongos controles, nos dois períodos.

Para comprovar se havia diferença estatística entre porcentagem de todos os tipos de túbulos seminíferos avaliados, pós-tratamento com o quimioterápico, realizamos o teste T não pareado e comparamos os animais tratados com 4 semanas e os animais controle. Primeiramente avaliamos a relação da porcentagem de túbulos tipo 1 com espermatogênese completa e tipo 3 sem espermatogênese e este mostrou diferença estatística (Tipo1; $p=0,0008$) (Figura 40A) e (tipo3; $p<0,0001$) entretanto quando comparamos com o tipo 2 não havia diferença estatística (tipo2; $p=0,6450$) (Figura 40).

Figura 40 - Porcentual dos 3 tipos de túbulos seminíferos em seção transversal do testículos de camundongos após 4 semanas de tratamento com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença estatística significativa entre os grupos de camundongos tratados vs controle após 4 semanas. Teste T não pareado. (* $p < 0,05$). (A) porcentagem de túbulos tipo 1 com 4 semanas vs controle, (B) tipo 2 vs controle, (C) tipo 3 vs controle.

Quando comparamos os animais com 6 semanas de tratamento e os controles, também comprovamos diferença estatística da mesma forma que nos animais de 4 semana os tipos de túbulos seminíferos (Tipo1; Tipo3; $p < 0,0001$), e com relação ao tipo 2 não houve diferença ($p = 0,0676$) (Figura 41). Por fim comparamos os animais tratado com 4 e 6 semanas e os resultados mostram que há diferença estatística entre os tipos 1 ($p = 0,0045$) e 3 ($p = 0,0005$), e não teve diferença estatística entre os tipos 2 ($p = 0,9728$) (Figura 41). Estes resultados demonstram que com 6 semanas temos um maior numero de túbulos seminíferos sem o processo espermatogênico.

Figura 41 - Porcentual dos 3 tipos de túbulos seminíferos seção transversal em testículos camundongos após 6 semanas de tratamento com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença estatística significativa entre os grupos de camundongos tratados vs controle após 6 semanas. Teste T não pareado. (* $p < 0,05$). (A) porcentagem de túbulos tipo 1 vs controle, (B) tipo 2 vs controle, (C) tipo 3 vs controle.

6.5.3.3 Imunohistoquímica

O estudo imuno-histoquímico demonstrou que as células germinativas do testículo dos camundongos expressaram proteína, presente em células germinativas de várias espécies, o DAZL e o PLZF, estes foram imunopositivos em todos os grupos de camundongos. Contudo, nos camundongos tratados não obtivemos marcação com DAZL em alguns túbulos seminíferos, nas células de Sertoli, espermatogônias indiferenciadas, espermatídes e espermatozoides (Figura 42), porém o PLZF foi detectado unicamente em espermatogônias indiferenciadas (Figura 43).

Figura 42 - Fotomicrografias da análise imunohistoquímica da proteína DAZL nos testículos dos camundongos tratados com Busulfan e controle

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A-F) DAZL, presente em espermatócitos (Es) e espermatogônias diferenciadas (Al). (D) negativo para células de Sertoli (Cs), espermatogônias indiferenciadas, espermatídes e espermatozoides (seta amarela). A proteína foi visualizada nos testículos dos camundongos tratados e controles. Barra: 20µm.

Figura 43 - Fotomicrografia análise imuno-histoquímico da proteína PLZF nos testículos dos camundongos tratados com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A-F) Imunomarcção PLZF em espermatogônias indiferenciadas (As). A proteínas foi visualizada nos testículos dos camundongos tratados e controles; (D) camundongos com 6 semanas de tratados alguns tubulos não havia celulas marcadas e (E) negativo para células de Sertoli (Cs) e Espermatogonia diferenciadas (seta amarela). Barra: 20µm.

Para compararmos a porcentagem de espermatócitos nos testículos dos animais 4 e 6 semanas pós o tratamento com Busulfan e os animais controle, utilizamos o número de túbulos seminíferos marcados e não marcados independente do tipo celular, pois segundo Ruggi et al. (2007) o DAZL é expresso em espermatócitos tipo preleptoteno, leptóteno, zigóteno e espermatogônias diferenciadas. Assim, conseguimos perceber que estatisticamente há diferença entre os grupos de 4 e 6 semanas de tratamento ($p=0,0100$) (Gráfico 9).

Posteriormente, comparamos a porcentagem dos tipos celulares imunopositivos para DAZL, e evidenciamos que quando realizamos esta comparação não há diferenças estatística, pois mesmo que o número de túbulos seminíferos que expressam estes anticorpos seja menor após 6 semanas, os túbulos que ainda apresentam positividade para DAZL, tem em seu lúmen espermatogônias e espermatócitos.

Gráfico 9 - Túbulos seminíferos positivo para DAZL após 4-6 semanas de tratamento com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença estatística significativa Grupos tratados 4 sem vs 6sem. *Teste t* não pareado. (* $p < 0,05$).

Para analisarmos o número de túbulos seminíferos das células marcadas por PLZF, foi utilizado o teste T não pareado, e obtimos resultados semelhantes ao do DAZL; houve diferença estatística nos animais com 6 semanas quando comparados com o camundongos controles ($p=0,0250$)(Gráfico 10), entretanto ao comparamos os camundongos após 4 semanas de tratamento e controles ($p=0,1336$) não há diferença estatística (Gráfico 11), e nem quando comparamos os camundongos com 4 e 6 semanas após o tratamento com o quimioterápico ($p=0,4349$).

Gráfico 10 - Túbulos seminíferos positivo para PLZF após 6 semanas de tratamento com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença estatística significativa entre os grupos de camundongos tratado tratados vs controle após 6 semanas. *Teste t* não pareado (* $p < 0,05$).

Gráfico 11 - Túbulos seminíferos positivo para PLZF após 6 semanas de tratamento com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados vs controle após 4 semanas. *Teste t* não pareado. ($p < 0,05$).

Gráfico 12 - Túbulos seminíferos positivo para PLZF após 4- 6 semanas de tratamento com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Não há diferença estatística significativa entre os grupos tratados vs controle após 4 e 6 semanas. *Teste t* não pareado. ($p < 0,05$).

Notavelmente, DAZL e PLZF expressaram nos camundongos tratados com a dose de 45mg/kg, entretanto a menor número de túbulos imunomarcados por estas proteínas foi observado após 6 semanas de tratamento, sugerindo que esta dose e neste período de 6 semanas de exposição ao fármaco, deprime as SSCs.

6.5.3.4 Parâmetros Espermáticos

Os parâmetros espermáticos demonstraram que com o tratamento do quimioterápico Busulfan, há uma diminuição no número de espermatozoides e na viabilidade destes. Assim, o número de espermatozoides por ml aspirados do epidídimo em ambos os períodos, demonstrou que com 6 semanas de tratamento, há um declínio no número de espermatozoides no sêmen destes animais $20,92 \times 10^4$ células/ml, quando comparados com o controle $189,4 \times 10^4$ células/ml e com os animais tratados com 4 semanas $32,92 \times 10^4$ células/ml, embora tenha diminuído o número de espermatozoides no sêmen, este foi observado em todos os animais avaliados (Tabela 7).

Tabela 7 - Contagem de espermatozoides por ml no epidídimo após tratamento Busulfan

Animais	Contagem esperma (média±dv) x 10 ⁴			
	4 semanas (md±sem)		6 semanas (md±sem)	
Tratado	32,92	16,6	20,8	9,55
Controle	216,80	55,89	186,4	60,0

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

O teste de viabilidade mostrou que houve uma diminuição da porcentagem de espermatozoides viáveis com o tempo de exposição do animal ao quimioterápico, portanto, com 4 semanas de tratamento havia em média 62,72% de espermatozoides viáveis e com 6 semanas 26,74% demonstrando que há diferença estatística entre os períodos de exposição ao fármaco ($p=0,0051$), sendo que com 6 semanas há espermatozoides no epidídimo destes animais, entretanto, o declínio da porcentagem de espermatozoides viáveis é mais acentuado (Gráfico 13) (Tabela 8).

Tabela 8 - Taxa de viabilidade (%) de espermatozoides aspirados do epidídimo após tratamento com Busulfan

Animais	Taxa De Viabilidade (X10 ⁴)	
	4 Semanas	6 Semanas
Tratados	62,72	26,74
Controle	85,6	60,32

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Gráfico 13 - Taxa de viabilidade (%) de espermatozoides aspirados do epidídimo após 4 e 6 semanas de tratamento com Busulfan

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Diferença estatística significativa entre os grupos tratados 4 semanas vs 6 semanas. *Teste t* não pareado. (* $p < 0,05$).

Quando comparamos os animais controle (60,32%) com os animais de 4 semanas pós tratamento com Busulfan (61,72%), demonstramos que houve uma diferença estatística sendo $p = 0,0393$, bem como a análise dos animais controles e tratados com 6 semanas também demonstrou diferença estatística entre eles $p = 0,0149$ (Figura 44).

Figura 44 - Taxa de viabilidade (%) de espermatozoides aspirados do epidídimo após 4 e 6 semanas de tratamento com Busulfan vs controle

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A)*Diferença estatística significativa entre os grupos de camundongos tratados vs Controle após 4 semanas (B) Diferença estatística significativa entre os grupos de camundongos tratados vs Controle após 6 semanas. *Teste t* não pareado. (* $p < 0,05$).

Portanto, estes resultados sugerem que com 6 semanas há menor porcentagem de espermatozoides viáveis no epidídimo dos camundongos C57Bl/6 tratados com Busulfan, sendo assim estas duas (4-6) semanas pós tratamento com Busulfan são cruciais para o declínio da atividade espermática e consequentemente imunossupressão dos camundongos.

6.5.4 Discussão e Conclusão

De acordo com Shinohara; Inoue e Ogonuki (2002) um dos fatores para o sucesso da colonização dos túbulos seminíferos pelas células germinativas do doador no transplante celular, é a competência no tratamento de agentes alquilantes que removem as células tronco endógenas e aumentam a acessibilidade ao microambiente testicular, por esta razão realizamos este experimento para eleger o melhor período para iniciar o transplante das células tronco espermatogoniais caninas.

Neste experimento determinamos o grau de degeneração da espermatogênese dos testículos dos camundongos C57BL/6 tratados com 45mg/kg de peso corporal de Busulfan. Foi eleita a dose de 45mg/kg, pois segundo Knatsu-shinohara et al. (2003;2010), o qual testou três doses (15, 30 e 45mg/kg) deste quimioterápico em camundongos C57BL/6 após 70 dias os animais tratados com 45mg/kg não havia células germinativas, na maior parte dos túbulos seminíferos, igualmente conferido em nossos achados no período de 42 dias (6 semanas).

O Busulfan é facilmente administrado por uma única dose intraperitoneal, o requisito para a esterilização dos animais é a dose administrada, e esta é amplamente variada entre as espécies, em camundongos é comumente utilizado a dose entre 40-44mg/kg conforme realizado por Dobrinski et al. (1999); Shinohara et al. (2000); Brinster e Avabock (1994), além de De-Zhi Wang et al. (2010) mostraram que para camundongos BALB/C a dose de 50mg/kg é letal, por estas razões a dose de 45mg/kg foi escolhida para este trabalho.

De acordo com De Roij e Russell (2000), em camundongos o ciclo espermatogênico completo dura em média 35 dias, portanto escolhemos um período de 4 e 6 semanas para monitorar a restauração da espermatogênese nestes animais. Nagano et al. (1999); Anjamrooz et al. (2007) e Zohni et al. (2012) citam que com 4 semanas após o tratamento as células em processo de diferenciação não estão presentes no lúmen dos túbulos e alguns camundongos estão inférteis. Contudo, a primeira análise para o monitoramento da restauração da espermatogênese foi realizada quatro semanas pós o tratamento.

Nossos achados relatam que com seis semanas após a injeção com Busulfan (45mg/kg), histologicamente ocorreu diminuição do diâmetro tubular, massa testicular e parada do ciclo espermatogêneses nos camundongos, da mesma forma que observado por Chi et al. (2013) em ratos, segundo os autores a diminuição do diâmetro tubular ou atrofia dos túbulos nos animais tratados com Busulfan está relacionada à perda das células espermatogênicas.

O diâmetro e massa testicular diminuíram conforme o tempo de exposição dos animais ao quimioterápico, sendo com 6 semanas pós tratamento mais significativa esta diminuição, entretanto Anjamrooz et al. (2007) e Kanatsu-Shinohara et al. (2003), mencionam que a degradação induzida por Busulfan é dose-dependente e pode ser reversível. Prez-crespo et al. (2011) menciona que após 63 dias de tratamento com Busulfan, o diâmetro tubular foi reduzido e várias anomalias morfológicas foram notadas nos camundongos CD-1, como visualizados neste experimento em camundongos C57BL/6.

Entretanto, não foi observado histologicamente alterações em células de Sertoli, igualmente conferido por outros autores, Perez- Crespo et al. (2011) mencionam que as células de Sertoli, não são afetadas por este quimioterápico. Contrapondo estes achados, Sofikitis et al. (2003) relataram que a maior concentração de Busulfan pode prejudicar a função de secreção das células de Sertoli e impedir a capacidade destas células de suportar as células germinativas diferenciadas do doador.

A duração da infertilidade seguida ao tratamento de Busulfan depende da amplitude e depleção das células tronco pelo fármaco e da dose de administração (BUCCI; MEISTRICH, 1987), portanto, neste experimento notamos morfológicamente que os animais tratados apresentavam túbulos seminíferos anormais, ou seja, com apenas células de Sertoli na membrana basal, diferentemente dos animais não tratados, confirmando que este agente alquilante causa a inibição da mitose e tem efeito intoxicante em células na fase G1 (DE ROOIJ; KRAMER 1970).

Segundo Knatsu-shinohara et al. (2003) 35 dias após tratamento com Busulfan (45mg/kg) em camundongos C57BL/6 apenas 0.8% túbulos seminíferos apresentavam espermatogêneses, diferentemente do nosso estudo, o qual aos 42 dias de experimento 35,33% dos túbulos apresentavam espermatogêneses. Entretanto, conforme mencionado pelos autores supracitados 70 dias após o tratamento, histologicamente nos testículos não havia muitas células germinativas, igualmente observado em nossa pesquisa com 6 semanas (42dias) pós tratamento.

De-Zhi Wang et al. (2010) citam que 4 semanas após a injeção de 30mg/kg do quimioterápico mais de 90% dos túbulos não apresentavam mais espermatogêneses, com a deleção de 95% das células haplóides, diferentemente dos camundongos C57BL/6 que apresentavam apenas 46% dos túbulos sem espermatogêneses.

Em camundongos, o *DAZL* é expresso em espermatogônias diferenciadas e espermatócito primários predominantemente, como evidenciados neste experimento. Entretanto sabe-se que o gene *DAZL* é a chave do fator intrínseco para iniciar a meiose em

reposta a fatores extrínsecos (HUANG et al., 2008), pois esta envolvido na regulação do MVH e SPC3 das células em meiose. (RUGGI et al., 2007; RENOLDS et al., 2005; 2007). Assim, não obtivemos marcação positiva para células de Sertoli, espermatogônias indiferenciadas, espermatídes e espermatozoides nos animais analisados nesta pesquisa.

Apenas uma; duas ou nenhuma célula tronco espermatogonial foi imunopositivas para PLZF nos túbulos seminíferos nos animais tratados com Busulfan neste experimento, assim estes achados confirmam os estudos anteriormente realizado, o qual segundo a literatura o Busulfan destrói todas as espermatogônias tipos A diferente de outros quimioterápicos, este elimina as células tronco espermatogoniais em várias espécies. Assim, a maior dose destrói as progenitoras de diferenciação e como consequência causa a depleção dos espermátócitos e espermatídes e posteriormente das espermatogônias diferenciadas (DE ROOIJ; KRAMER, 1970; KANATSU-SHINOHARA et al., 2003).

Ao analisarmos os resultados da expressão de DAZL, comparamos os animais tratados após 4 semanas e controle, e notamos que o número de túbulos seminíferos positivos não teve diferença estatística ($p=0,1336$), entretanto segundo Anjamorooz et al. (2007) ao contar espermátócitos este notou efeito significativo após 4 semanas de tratamento.

Ao analisar o número de túbulos positivos nos animais tratado pós 4 semanas e os controles, não se obteve diferença estatística, isto se deve ao valor de p , diferentemente ao inferirmos os animais tratados pós 6 semanas de tratamento com Busulfan ($p<0,05$), com os controles nota-se diferenças estatística entre eles. Portanto, mesmo com um número baixo de animais notamos que no período de 6 semanas, ocorre a deleção da espermatogênese, da mesma forma que relatado por Anjamorooz et al. (2007).

A fim de finalizarmos esta etapa, avaliamos os parâmetros espermáticos dos camundongos tratados e controles nos dois períodos, notamos que após 6 semanas de tratamento há um declínio na viabilidade dos espermatozoides, quando comparado com os camundongos controles e tratados com 4 semanas, assim como mencionado por Anjamorooz et al. (2007), o qual menciona este parâmetro bem acentuado no período de 6 semanas de tratamento em camundongos (NMRI); diferente dos animais com 4 e 8 semanas, segundo os autores este declínio na viabilidade dos espermatozoides não são tão óbvios. Eles também descrevem que com 40mg/kg dose da droga, não há viabilidade ou mobilidade dos espermatozoides, diferentemente dos nossos achados em que com 45mg/kg dose da droga, nos observamos espermatozoides viáveis.

Portanto, todos os parâmetros avaliados, diâmetro tubular, peso testicular, análises morfométricas e viabilidades espermáticas, indicam que houve o declínio da espermatogênese

nos camundongos C57Bl/6 com dose de 45mg/kg da droga após 6 semanas de tratamento, sugerindo que com 4 semanas há uma diminuição inicial em relação a estes parâmetros, mas é necessário no mínimo 6 semanas para que estes sejam acentuado, e que o Busulfan seja capaz de promover um recipiente estéril e um microambiente confiável nos animais tratados e assim poder realizar com sucesso o xenotransplante das células germinativas caninas.

Capítulo 6 (Experimento 6) –
Xentransplante das células tronco espermatogoniais caninas em camundongo

6.6 EXPERIMENTO 6 - XENTRANSPLANTE

6.6.1 Delineamento Experimental

O Ensaio de xenotransplante foi dividido em três experimentos distintos, nos quais foram avaliados parâmetros diferentes que podem causar o insucesso do xenotransplante das células germinativas caninas em camundongos C57Bl/6 (Figura 45).

- **Xenotransplante- Experimento 1**

As células germinativas de cão pré-púberes podem restabelecer a espermatogênese dos camundongos C57Bl/6 receptores?

- **Xenotransplante- Experimento 2**

A idade do cão doador pré-púbere ou adultos pode influenciar o potencial de repovoamento das células germinativas nos túbulos seminíferos dos camundongos C57Bl/6 receptores?

- **Xenotransplante- Experimento 3**

O tratamento *in vitro* com hormônio FSH nas células germinativas de cães pré-púberes pode auxiliar no sucesso do transplante *in vivo*?

Figura 45 - Delineamento Experimental

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

6.6.2 Xenotransplante - Experimento 1

As células germinativas de cão pré-púberes podem restaurar a espermatogênese dos camundongos C57Bl/6 e estas podem ser encontradas no túbulo seminífero destes animais após longo período pós transplante. Neste experimento levamos em consideração os resultados relacionados ao *Experimento 2- Caracterização das SSCs caninas in vitro* descritos anteriormente.

6.6.2 Material e Métodos

6.6.2.1 Obtenção das células transgênicas

Para identificar as células germinativas caninas após o transplante, as SSCs de três cães pré-púberes foram utilizadas (<3-6 meses). As células germinativas foram cultivadas e submetidas ao procedimento de transdução com o lentivírus LacZ e eGFP. De acordo com Nagano et al. (1999) e Kubota et al. (2011) no transplante com espermatogônias cada colônia é derivada de uma única célula tronco e o uso do LacZ e GFP facilita a quantificação e identificação destas células.

Para as modificações genéticas foram utilizados o vetor Lentiviral LV-LacZ (Addgene) que contém a sequência bacteriana *Escherichia coli lacZ* (LacZ), que codifica uma proteína beta-galactosidase e o lentiviral, que codifica a proteína fluorescente verde (GFP) gene repórter e tem uma região HIV-Flap e a região regulatória pós-transcricional do vírus hepatite da marmota (*Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, WRE*), além das LTRs (*Long Terminal repeat sequences*) (BRESSAN, 2008; FEITOSA et al., 2010).

Os Lentivírus competentes para replicação contendo o gene LacZ foram produzidos por meio da transfecção de células 293FT (InvitrogenTM, Carlsbad, Califórnia, EUA) com os respectivos plasmídeos de empacotamento e LacZ. O sobrenadante desta transfecção foi filtrado, alíquotado e estocado em freezer -80°C. Para a transdução com o vetor, retirou-se o meio de cultivo dos poços nos quais as células apresentavam morfologicamente saudáveis e acrescentou meio novo, em quantidade reduzida contendo lentivírus e 4µg/ml de brometo de hexametadina (Polibreno, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), este é utilizado para

aumentar a transdução por neutralizar a repulsão de cargas entre o vírus e as membranas celulares (BRESSAN, 2008; De BARROS et al., 2012). Após 12 horas de incubação foi retirado o meio com o vírus e adicionado meio sem o vírus.

6.6.2.2 Análise da expressão do gene exógeno LacZ e eGFP nas células tronco germinativa canina transduzidas

Para verificar a eficiência da transdução das células germinativas caninas utilizou-se as técnicas de citometria de fluxo para avaliar a porcentagem de células positivas que expressam eGFP e utilizamos as reações com o corante X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside) para analisar as células positivas que expressavam a proteína beta-galactosidase. A detecção da expressão de Beta-galactosidase por reação enzimática de X-gal nas células germinativas, portanto, o meio de cultivo foi removido e a solução de 0,5% de glutaraldeído adicionada sobre as células por 15 minutos em temperatura ambiente, em seguida a solução foi removida e as células lavadas com PBS. Em seguida, a solução de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactopyranoside, 1mg/ml, Cat#V3941, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) foi adicionada nas células e incubadas a 37° C por 1-6 horas.

Para a detecção das células positivas para eGFP, avaliamos em média $9,5 \times 10^5$ células/ml transduzidas e avaliadas pelo citômetro de fluxo (BD FACSAria™, Becton Dickinson, East Rutherford, Nova Jérсия, EUA) e pelo software BD FACSDiva™ (BD, Becton Dickinson, East Rutherford, Nova Jérсия, EUA).

6.6.2.3 Transplante SSCs caninas transfectadas

As SSCs de três cães pré-púberes foram transduzidas com os lentivírus eGFP e LacZ, para a injeção das células germinativas caninas. Primeiramente realizou-se um mix celular e posteriormente as células foram contadas, para avaliar a quantidade de células injetadas por testículo. Portanto, foram injetadas em 18 camundongos C57Bl/6 adultos tratados com Busulfan por 6 semanas antes do transplante (Quadro 3).

Quadro 3 - Número de animais e células transplantadas por testículo de camundongos receptores

Número de animais	Transfecção	Quantidade injetada	Local de administração celular
9	GFP	0,68 10 ⁴ /10µl	Ducto eferente e rede testicular (OWAGA et al., 1997) modificada
9	LacZ	0,95 x10 ⁴ /10µl	
6	Sem inoculação, animal controle.		

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

Para a realização da técnica de transplante das células germinativas utilizou-se uma lupa (Nikon, Chiyoda, Tóquio, Japão) e seringa BD Ultra-Fine™ calibre: 0.30 mm (30G, BD, Becton Dickinson, East Rutherford, Nova Jérсия, EUA). Os animais foram anestesiados com ketamina (50mg/kg) e xilazina (15mg/kg) e os testículos foram exteriorizados, por incisão abdominal de 1 a 1.5cm, e uma incisão de 2 a 3mm foi feita na túnica dartos.

Aproximadamente, 10µl solução com 0.4% Azul de tripan (Cat#15250-061, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 1.10^5 SSCs caninas foram injetadas manualmente no ducto eferente em cada testículo, 90% dos túbulos seminíferos foram preenchidos com células do doador (OWAGA et al., 1997; MA et al., 2011) (Figura 46).

Para a microinjeção de vários túbulos seminíferos, a agulha foi inclinada e inserida no ducto eferente, localizado cranialmente a artéria testicular e lentamente foi injetada a solução de SSCs caninas com azul de tripan até o preenchimento dos túbulos, conforme Brinster e Nanago (1998); Owaga et al. (1997) e Rilanawati et al. (2003) (Figura 46C).

Figura 46 - Técnica de microinjeção das células tronco espermatogonial (SSCs) caninas no ducto eferente dos camundongos C57Bl/6

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda:(A) agulha foi inserida no ducto eferente, localizo cranial a artéria testicular, entre a cabeça do epidídimo e testículo (inserinda proximo a rede testicular);(B) pequena quantidade de solução de corante azul (Typan Blue) injetados lentamente, para ajudara visualizar os dutos, sendo preenchidos, primeiramente a rede testicular e posteriormente todos os túbulos seminíferos e (C) Testiculo totalmente preenchido em azul, indicando que a solução foi introduzida e preencheu a maioria das áreas de túbulos seminíferos. Barra: 1cm.

A introdução da agulha no ducto eferente promoveu o preenchimento da rede testicular e posteriormente dos túbulos seminíferos, entretanto este procedimento foi realizado lentamente devido à pressão do fluxo inverso, o qual os espermatozoides estão sendo liberados na rede testicular e seguindo para o epidídimo onde serão armazenados por meio do ducto eferente. Após a injeção, os testículos foram recolocados na cavidade abdominal e a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de sutura de 0-6mm (Silkam®, B. Braun Melsungen, Melsungen, Alemanha). Os animais receberam analgésicos e anti-inflamatório por via oral e todos os cuidados após o termino do experimento.

6.6.2.4 Análise do animal receptor após o transplante

Para o ensaio de eficiência da transfecção e xenotransplante, os camundongos foram avaliados em dois grupos: **G1**- camundongos tratados com Busulfan e receberam as células do doador (receptores, n=18), e **G2**- camundongos que foram tratados apenas com Busulfan (controles, n=6). Os camundongos receptores com células LacZ⁺ foram mantidos por períodos de 40, 70 e 90 dias, portanto foram sacrificados por períodos 9 camundongos sendo: n=3 GFP⁺, n=3 LacZ⁺ e n=2 controles, os quais representam 2 ciclos completos da espermatogênese do cão e 2 ciclos e meio da espermatogênese do camundongo. Todos os camundongos foram eutanasiados por meio da câmara de CO₂.

Todos os animais e os testículos foram pesados pós-eutanasia e mensurados individualmente. Os testículos injetados com células transduzidas com o lentivirus LacZ, foram fixados em formaldeído 4% por 24 horas e posteriormente incubados em solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-gal) (Cat#V3941, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) por 12 horas, para detectar a expressão da enzima β -galactosidase (NAGANO et al., 1999). Estas foram posteriormente desidratadas, embebidas em parafina e os blocos foram cortas em secção 8 μ m e coradas com hematoxilina e eosina.

Os testículos dos camundongos receptores que receberam as células GFP⁺ foram fixados em meio de congelamento e armazenados a -80°C. Para contagem do número de colônias positivas, utilizamos um microscópio epifluorescência Zess (Zeiss, Göttingen, Alemanha) com objetiva de 200x. A imagem digital foi adquirida usando software AxioVision (Zeiss).

As colônias LacZ e GFP foram coradas e contadas para cada testículo do camundongo receptor, conforme os protocolos adaptados de Oatley et al. (2004), Rilianawati et al. (2003) e Ryu et al. (2007). Avaliamos também a média e a porcentagem de 10 túbulos seminíferos que expressaram β -galactosidase em azul. Para as células eGFP positivas calculamos o número de células positivas e negativas em três campos aleatórios na objetiva de 200x, e para avaliar a porcentagem de túbulos seminíferos que eram GFP+, realizamos a contagem das células positivas em 15 túbulos seminíferos em três secções, portanto um total de 30 túbulos avaliados por animal, sendo estes escolhidos de formas aleatórias em cada secção do testículo dos camundongos receptores. Estes dados foram avaliados estatisticamente por meio do teste ANOVA (*one way-noparametric*), pelo software graphpad prism 5.

6.6.3 Resultados

As células germinativas adultas caninas foram transplantadas em camundongos imunodeficientes para investigar a capacidade de colonização *in vivo*, e se estas células poderiam colonizar o túbulo seminífero do camundongo receptor além de manter-se na membrana basal por longos períodos.

As células germinativas caninas transduzidas com GFP estavam presentes em razoável número no testículo do animal receptor; estas se encontravam em pares ou colônias presas à membrana basal dos túbulos. Estes dados indicam que SSCs caninas transplantadas eram células funcionais. Nos animais controles não foram identificados nenhuma célula germinativa canina (Figura 47A).

Análise morfológica do testículo dos camundongos receptores e controles indicou que aos 25 dias após o transplante, as células GFP+ podem ser identificadas em colônias na membrana basal do túbulo seminífero do animal receptor, sendo que 30,59 % das células transplantadas ($0,6 \times 10^5$) eram positivas e 69,41% eram negativas em 461 células contadas, em média $8,67 \pm 1,89$ colônias por testículo foram encontradas (Figura 47A; B). Após 25 dias 56,67% dos túbulos seminíferos apresentavam células germinativas caninas GFP+, sendo em média $3,73 \pm 0,95$ por túbulo.

Aos 70 dias após transplante o camundongo receptor apresentava no túbulo seminífero em média $2,9 \pm 0,95$ células germinativas caninas GFP+, sendo estas encontradas em 63,3%

dos túbulos seminíferos avaliados. Nestes animais a porcentagem de células positivas foi de 6,4% de um total de 936 células totais contadas em três campos aleatórios.

Aos 90 dias após o xenotransplante, encontramos colônias de células GFP+, localizadas na membrana basal dos túbulos. As células fluorescentes estavam presentes em 63,3% dos túbulos seminíferos no testículo dos animais receptores, sendo 19,4% das células positivas e $5,67 \pm 1,70$ colônias, de um total de 355 células contadas. Na avaliação do número de células positivas por túbulo seminífero em média $8,13 \pm 1,82$ foram encontradas no túbulo dos animais receptores. Em nenhum dos períodos avaliados foram identificados teratomas (Figura 47 D; E)

Figura 47 - Fotomicrografia dos túbulos seminíferos dos camundongos pós transplante, células germinativas GFP+

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A) e (B) 25 dias pós transplante, (D) e (E) 90 dias após o transplante das, nota-se que houve número razoável de células GFP+ no testículo do receptor, estas encontravam-se em pares (asterisco) ou colônias (seta vermelha) presas a membrana basal dos túbulos (seta). Indicando a presença de SSCs funcionais na população transplantada. (C) e (F) nos animais controles tratado com Busulfan não foram identificados nenhuma célula germinativa canina.

Ao comparar o número de células positivas por túbulo seminífero dos animais que receberam as células germinativas caninas após 25, 70 e 90 dias de transplante, estes apresentaram diferença estatística significativa ($p=0,0080$), demonstrando que aos 90 dias havia uma maior quantidade de células positivas $8,13 \pm 1,82$ do que aos 25 dias $3,73 \pm 0,95$ e

aos 70 dias $2,90 \pm 0,64$ pós transplante destas células. Entretanto, não há diferença estatística entre os períodos de 25 e 70 dias após o transplante ($p > 0.001$) e não há diferença estatística entre a porcentagem de túbulos seminíferos com células GFP+ entre os dois períodos analisados (Figura 48).

Figura 48 - Média e a porcentagem de SSCs caninas GFP + encontradas no testículo de camundongos nos períodos de 25, 70 e 90 dias pós transplante

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Gráficos comparando a média de células e túbulos seminíferos GFP positivos nos camundongos receptores nos períodos de 25, 70 e 90 dias após o transplante. * diferença estatística significante. Teste ANOVA ($p < 0,05$).

Nos animais receptores macroscopicamente alguns túbulos seminíferos foram corados com X-gal (azul), entretanto ao avaliar histologicamente não encontramos células LacZ-positivas em nenhum dos períodos analisados (Figura 49). Entretanto, em um camundongo receptor que morreu inesperadamente após 5 dias do transplante, detectamos a presença de algumas células coradas com X-gal no lúmen do túbulo seminífero (Figura 49) e nos grupos controles no período de 40, 70 e 90 dias haveram alguns túbulos que recuperam a espermatogênes (Figura 50 D, H e M).

Figura 49 - Fotomacro e micrografias dos testículos do camundongo receptor 5 dias pós transplante das SSCs caninas (LacZ+)

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A), (B) e (C) destaque as poucas células coradas em azul, no lúmen do túbulo seminífero. (D) testículo do camundongo receptor corado em azul. Barra: 20µm; 1cm.

Figura 50 - Fotomacro e micrografias dos testículos dos animais receptores das células germinativas caninas LacZ-positivas com 40, 70 e 90 dias pós transplante

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A), (E) e (I) Macroscopicamente alguns túbulos seminíferos foram corados com X-gal (azul), (B), (C), (F), (G), (J) e (L) microscopicamente não encontramos células LacZ -positivas em nenhum dos períodos analisados. (D), (H) e (M) grupo controle com presença de espermatozoides. Barra: 20µm; 1cm.

Outro fator avaliado foi à presença de espermatozoides do doador no epidídimo do animal receptor, entretanto não visualizamos nenhum espermatozóide canino. Todos os espermatozoides apresentavam morfologia normal de camundongo.

Desta forma, estes resultados sugerem que o transplante das células germinativas caninas transfectadas com GFP proliferam no túbulo seminífero dos animais receptores durante vários meses, além de manter o perfil antigênico *in vivo*. Conforme, demonstramos na análise estatística aos 90 dias pós transplante onde há uma tendência a aumentar o número de células positivas nos túbulos seminífero dos camundongos receptores do que aos 25 e 70 dias. Portanto, esta análise propõe que estas células provavelmente são SSCs ou espermatogônias caninas em estágio inicial e que após o transplante estas precisam de um período superior a 25 dias para proliferarem no túbulo seminífero do animal receptor.

6.6.4 Xenotransplante-Experimento 2 e 3

Para estes experimentos foram levados em consideração os resultados descritos nos experimentos: **6.3- Experimento 3 - COMPARAÇÃO IN VIVO E IN VITRO DAS CÉLULAS TRONCO ESPERMATOGONIAIS DE CÃES PRÉ-PÚBERES E ADULTOS** *E NO* **6.4 Experimento 4- Análise da adição de FSH in vitro das SSCs caninas;**

Nestes dois experimentos utilizamos o mesmo material e método descrito abaixo, portanto para melhor compreensão do leitor, optamos por descrever este item uma única vez e o resultado de cada experimento foi descrito de forma separada.

6.6.4.1 Material e Métodos

6.6.4.1.1 Transdução e análise da expressão do gene exógeno eGFP nas células tronco germinativa canina

Para identificar as células germinativas caninas após o transplante, as SSCs de cães pré-púberes e adultos foram transduzidas com a proteína fluorescente verde (eGFP) gene repórter, conforme descrito no item: **6.6.2.1.1. Obtenção das Células Transgênicas.**

Foram transduzidas em média $10,8 \times 10^5$ células/ml dos cães pré-púberes (n=3); $36,05 \times 10^5$ células/ml adultos (n=3) e $12,75 \times 10^5$ células/ml dos cães pré-púberes tratados com FSH *in vitro* (n=5), para comprovar a eficiência da transfecção do gene repórter GFP nas células tronco germinativas caninas (SSCs) foram avaliadas pelo citômetro de fluxo (BD FACS Aria™, Becton Dickinson, East Rutherford, Nova Jérсия, EUA) e analisadas pelo software BD FACSDiva™ (BD, Becton Dickinson, East Rutherford, Nova Jérсия, EUA).

6.6.4.1.2 *Análise do perfil fenotípico das células transplantadas nos camundongos receptores*

Para caracterizar e comprovar o perfil fenotípico das células que foram injetadas nos camundongos C57Bl/6 no dia do transplante realizamos a análise de citometria de fluxo com os marcadores de pluripotência e específicos para células germinativas, GFRA1, DAZL, C-kit, integrina alpha 6, PLZF, OCT4, STRA8, conforme protocolo descrito no **Experimento 3-COMPARAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DAS CÉLULAS TRONCO ESPERMATOGÔNIAS DE CÃES PRÉ-PÚBERES E ADULTOS**, no item: **6.3.2.3.2.**

Análise de Citometria de fluxo

Em média 170×10^4 células /ml dos cães adultos, 65×10^4 células /ml dos cães pré-púberes tratadas com FSH *in vitro* e 91×10^4 células /ml dos cães pré-púberes estavam vivas no dia do transplante, portanto para avaliação por citometria de fluxo, optou-se por padronizar o número de células avaliadas, sendo 8×10^4 células /ml para cada anticorpo. Avaliamos também a porcentagem de células que expressavam o GFP, para comprovação da transdução estas células, para isto utilizou-se o citômetro de fluxo (BD FACS Aria™, Becton Dickinson, East Rutherford, Nova Jérсия, EUA) e analisadas pelo software BD FACSDiva™ (BD, Becton Dickinson, East Rutherford, Nova Jérсия, EUA).

6.6.4.1.3 *Transplante SSCs caninas transfectadas*

As células germinativas que expressaram o gene repoter eGFP dos cães (n=6) foram transduzidas e transplantadas em 13 camundongos C57Bl/6 adultos tratados com Busulfan

por 6 semanas, divididos em 4 grupos: G1 células germinativas caninas adultas (n=5), G2: células germinativas caninas pré-púberes (n=3), G3 células germinativas caninas pré-púberes tratadas com FSH (n=5), G4 controle (n=3) apenas injeção de solução fisiológica (Quadro 4). Todos o procedimento para a injeção das células foi realizado com mencionado no **Experimento 6- Xenotransplante-Experimento 1, no item: 6.6.2.3 Transplante SSCs caninas transduzidas.**

Quadro 4 - Tipo celular e quantidade de células germinativas caninas transplantadas nos camundongos receptores

Camundongos receptores	Células caninas	Células transduzidas	Gene reporter	Quantidade injetada	Local de administração celular
5	SSCs +FSH	12,75.10 ⁵	eGFP	10 ⁵ /10μl	Ducto eferente e rede testicular (OWAGA et al., 1997) modificada
3	SSCs Pré- púberes	10,8 .10 ⁵	eGFP	10 ⁵ /10μl	
5	SSCs adulto	36,05 .10 ⁵	eGFP	10 ⁵ /10μl	
3	Sem inoculação, animal controle.				

Fonte: PIERI, N. C. G., 2016).

6.6.4.1.4 Análise do animal receptor após o transplante

Para o ensaio de eficiência do xenotransplante, foram avaliados os grupos G1 células germinativas caninas adultas (n=5); G2: células germinativas caninas pré-púberes (n=3) e G3 células germinativas caninas pré-púberes tratadas com FSH (n=5). Todos os camundongos receptores foram mantidos por 70 dias, o qual representaram 1 ciclo completo e uma semana da espermatogênese do cão (1ciclo: 60dias) e 2 ciclos completos da espermatogênese do camundongo (1ciclo:35dias).

Todos os animais foram pesados antes de serem eutanasiados e os testículos foram pesados e mensurados pós os animais serem eutanasiados. Os testículos que receberam as células GFP+ foram fixados em meio de congelamento (TISSUE-TEK O.C.T. COMPOUND, Cat# SAKU-4583, SAKURA AMERICAN, SAKURA FINETEK USA) e armazenados a -80°C. As colônias GFP foram coradas e contadas para cada testículo do camundongo receptor, conforme os protocolos adaptados de Oatley et al. (2004), Rilianawati et al. (2003) e Ryu et al. (2007), e avaliamos as células eGFP positivas, por meio do cálculo do número de células

positivas e negativas em três campos aleatórios na objetiva de 200x, E a porcentagem de túbulos seminíferos que eram GFP+, realizamos a contagem das células positivas em 15 túbulos seminíferos em três secções, portanto um total de 30 túbulos foram avaliados por animal, sendo estes escolhidos de formas aleatórias em cada secção do testículo dos camundongos receptores.

Para análise estatística do experimento 2 de xenotransplante comparamos os dois grupos de camundongos que receberam as células germinativa dos cães adultos e pré-púberes, por meio do teste estatísticos *teste t* não paramétrico (Mann-whitney teste) ($p > 0,05$), realizada pelo software GraphPad Prism 5, para comprovar se a idade reprodutiva dos animais doadores influenciava o sucesso do xenotransplante.

No experimento 3 de xenotransplante comparamos os grupos de camundongos que receberam as células dos cães pré-púberes tratadas com FSH *in vitro* e os camundongos que receberam as células sem o tratamento de FSH com esta mesma idade reprodutiva., por meio do *teste t* -não paramétrico (Mann-whitney teste) ($p > 0,05$).

6.6.4.1.5 Análise de PCR para DNA α -satelite canino

Para detectar a presença de células caninas nos testículos dos camundongos receptores extraiu-se o DNA genômico das amostras do epidídimo dos camundongos 70 dias após o transplante das células germinativa caninas. As amostras foram amplificadas por PCR qualitativo utilizando primers específicos para DNA α -satelite canino (REIMANN et al., 1996; DOBRINSKI et al., 1999). As extrações do DNA das amostras foram realizadas pelo QIAamp tecido kit (Cat#69509, Qiagen Inc., Santa Clarita, CA).

O DNA genômico de um camundongo não injetado foi utilizado como controle negativo e o DNA genômico de cão, extraído apartir de uma amostra de testículo foi utilizado como controle positivo. Um micrograma de DNA foi amplificado com 20 pmol de primer em 30 ciclos (95°C, 30s; 60°C 15s; 68°C 1 min). Os produtos de PCR (324 pares de bases) foram visualizados em etídio bromidestained 1,5% de gel de agarose.

6.6.4.2 Resultados – Experimento 2

No experimento 2- realizamos o experimento baseado na seguinte pergunta: A idade do cão doador pré-púbere e adultos pode influenciar o potencial de repovoamento das células germinativas nos túbulos seminíferos dos camundongos C57Bl/6 receptores?

6.6.4.2.1 Análise do perfil fenotípico das células transplantadas nos camundongos receptores

No dia do transplante as células germinativas caninas foram caracterizadas fenotipicamente para avaliar a porcentagem de SSCs caninas transplantadas e para avaliar a transdução das células germinativas com eGFP, estas foram analisadas e em média 10,4% das células germinativas de cães pré-púberes expressavam GFP+ e 1,2% foram positivas aos cães adultos.

Nas células dos cães pré-púberes analisadas menos de 5% foram positivas para C-kit (3,92), DAZL (1,22 %), PLZF (1,22%), OCT4 (1,33%) e STRA (8 2,48%), sendo negativa para os demais marcadores GFRA1 e integrina alpha 6 (CD49f). Estes dados mostram que estas células no dia da aplicação haviam baixa porcentagem de espermatogônias, que são as células foco deste estudo, e promotoras do sucesso do xenotransplante.

As células dos animais adultos tiveram uma elevada expressão de STRA8 (27,6%) ao comparamos com os outros marcadores, entretanto diferente dos animais pré-púberes, foi observado a expressão de todos os marcadores, embora menos de 5% das células avaliadas foram positivas para GFRA1 (0,92%), C-kit (1,7%), DAZL (4,1%) e negativa para integrina alpha 6 (CD49f), geralmente encontrado em células diferenciadas e indiferenciadas. No entanto, observou se uma alta expressão de OCT4 (14,8%), PLZF (10,65%), os quais são específicos marcadores de SSCs e STRA8 (27,6%) proteína encontrada em células diferenciadas nesta idade reprodutiva. Estes resultados demonstram que nos testículos de cães adultos, no momento do transplante havia uma população heterogênea com células tronco espermatogoniais e células em processo de diferenciação (meiose).

Contudo, quando comparamos as características fenotípicas das células germinativas caninas coletadas nas duas idades reprodutivas adultos e pré-púberes, notamos que no

momento do transplante a maior porcentagem de SSCs foram encontradas na população de células coletados dos testículos dos cães adultos, sendo mais de 10% das células positivas para OCT4 e PLZF e uma porcentagem de células diferenciadas DAZL (4,1%), C-kit (1,7%) e STRA8 (27,6%).

6.6.4.2.2 *Análise do Animal Receptor após o Xenotransplante*

As células germinativas caninas de animais pré-púberes e adultos foram transplantadas nos camundongos receptores para investigar se a idade do doador influencia o sucesso do xenotransplante, e, portanto, descrever a melhor idade reprodutiva para o transplante destas células. As células germinativas caninas transduzidas com GFP estavam presentes em razoável número no testículo dos camundongos receptores; estas se encontravam em pares ou colônias presas à membrana basal dos túbulos, como observado no experimento de xenotransplante anterior. Nos animais controles não foram identificados nenhuma célula germinativa canina (Figura 51).

No testículo dos camundongos receptores as células germinativas dos cães pré-púberes, 70 dias após o transplante também foram visualizadas pela análise imunofluorescência. As células positivas foram encontradas em 80% dos túbulos seminíferos avaliados dos camundongos receptores, sendo em média $6,24 \pm 0,78$ células e $1,22 \pm 0,17$ colônias positivas por túbulo. Ao avaliar a porcentagem de células positivas observou-se menor porcentagem sendo 4,7% das células e 99,3% negativas de um total de 2746 células contadas nos camundongos receptores após 70 dias do transplante.

Nos camundongos transplantados com células de cão adulto, após 70 dias do xenotransplante, encontramos colônias de células GFP+, localizadas na membrana basal dos túbulos. Células fluorescentes estavam presentes em 91,10 % dos túbulos no testículo dos animais receptores, sendo em média $2,55 \pm 0,23$ células positivas e $16,17 \pm 1,76$ colônias por testículo. A porcentagem de células positivas nos camundongos receptores foi em média de 10,7% sendo 98,6% das células negativas de um total de 2533 células contadas, ou seja, que não expressavam GFP, avaliadas no túbulo seminíferos dos camundongos receptores.

Ao comparar estatisticamente a porcentagem de túbulos seminíferos com células GFP+ dos camundongos que receberam células germinativas de cães da idade adulta e pré-púberes, este não mostrou diferença estatística ($p=0,1301$). Entretanto, ao avaliar número de

células GFP positivas por túbulo seminífero entre as duas idades, este mostrou uma diferença significativa entre as médias ($p=0.0003$) e entre o número de colônias de células positivas nos túbulos seminíferos dos camundongos receptores ($p<0,0001$), portanto, com estas análises podemos notar que os camundongos que receberam as células dos cães pré-púberes apresentaram um menor número de células GFP+ nos túbulos seminíferos (Figura 51).

Figura 51 - Fotomicrografias e análise da média de SSCs caninas GFP+ encontradas nos testículos camundongos receptores, 70 dias após transplante

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: **(A)** e **(B)** células GFP+ no testículo dos camundongos receptores. **(A)** animais que receberam células germinativas de cães adultos. **(B)** animais que receberam células germinativas de cães pré-púberes. **(C)** diferença estatística significativa. Teste *t* não pareado (* $p<0,05$).

6.6.4.3 Resultado – Experimento 3

Experimento 3- o Tratamento *in vitro* com hormônio FSH nas células germinativas de cães pré-púberes pode auxiliar no sucesso do transplante *in vivo*.

6.6.4.3.1 *Análise do perfil fenotípico das células transplantadas nos camundongos receptores*

Primeiramente analisamos a população de células germinativas dos cães pré-púberes tratadas com FSH *in vitro* no dia do transplante, e estas foram positiva para GFRA1, C-kit, DAZL, CD49f, PLZF, OCT4 e STRA8 e ao avaliarmos quantas células expressavam eGFP em média 9,5% das células foram positivas. A análise permitiu visualizar que mais de 15% das células eram positivas para OCT4 (16,98%), C-kit (14,37%) e PLZF (16,26%), embora 9,22% foram positivas para STRA8, estes dados demonstram que a população de células transplantadas nos camundongos receptores era bastante heterogênea, compostas por células diferenciadas e ou em meiose e por células tronco, sendo menos de 5% positivas para GFRA1 (3,12%), DAZL (6,27%) e CD49F (2,3%).

Nas populações de células germinativas dos cães pré-púberes sem o tratamento com FSH, menos de 4% das células avaliadas eram positivas para estes marcadores. GFRA1 (0,92%), C-kit (1,7%), DAZL (4,1%) e negativa para integrina alpha 6 (CD49f), OCT4 (14,8%), PLZF (10,65%) e STRA8 (27,6%). E ao avaliar a porcentagem de células GFP positivas estas apresentavam valores semelhantes as células tratadas com FSH, sendo 10,4% das células antes do transplante.

Portanto, no momento do transplante a população de células tratadas com FSH *in vitro*, demonstraram uma alta porcentagem de espermatogônias indiferenciada e diferenciadas em cultivo, uma vez que a porcentagem de células que expressavam OCT4, PLZF e C-kit era superior a 15%. E como tratamento de FSH a população de células transplantadas nos camundongos receptores era composta por células tronco espermatogônias (GFRA1, PLZF, integrina alpha 6 e OCT4+) espermatogônias diferenciadas (C-kit e DAZL+) e células em meiose (DAZL e STRA8+).

6.6.4.3.2 *Análise do animal receptor após o Xenotransplante*

A análise de imunofluorescência dos testículos dos camundongos que receberam células germinativas caninas tratadas com FSH, indicaram que 70 dias após o transplante, as células GFP+, podem ser identificadas em colônias na membrana basal do túbulo seminífero dos

camundongos receptor, sendo que 9,8% das células transplantadas (10^5 células/ testículos) foram encontradas no camundongo receptor e 98,8% das células eram negativas no testículo destes animais em um total de 2760 células contadas, em média $2,089 \pm 0,28$ colônias de células GFP+ foram encontradas por túbulos seminíferos. Ao avaliar a porcentagem de túbulos positivos, mostramos que em média 86,63% apresentam células caninas GFP positivas, embora a média de células positivas por túbulo seminífero avaliado era de $12,57 \pm 1,60$ células/túbulo.

Os camundongos que receberam as células sem o tratamento de FSH, foram encontradas em média $7,16 \pm 0,95$ células e $1,22 \pm 0,17$ colônias positivas por túbulo, sendo que 80% dos túbulos avaliados dos camundongos receptores eram positivos para GFP. Ao avaliar a porcentagem de células positivas observamos que uma menor porcentagem de células era positivas 4,7% e 99,3% eram negativas de um total de 2746 células contadas nos camundongos receptores após 70 dias do transplante (Figura 52).

A análise estatística revelou que existe uma diferença estatística entre a média do número de células GFP+ por túbulo seminífero entre os camundongos que receberam as células germinativas de cães pré-púberes tratadas com FSH ($12,57 \pm 1,60$) e os que receberam as células sem tratamento ($7,16 \pm 0,95$), sendo ($p=0,0087$). Em seguida analisamos o número de colônias de células GFP+ por túbulo seminífero e este também destacamos a diferença estatística entre as médias, ($p=0,0232$). A avaliação da porcentagem de túbulos seminíferos com células GFP+ não mostrou diferença estatística ($p=0,226$). Portanto, estes dados demonstram que os animais que receberam as células tratadas com FSH *in vitro*, apresentaram melhores parâmetros quanto ao número de células, colônias e porcentagem de túbulos seminíferos com células caninas GFP+ após 70 dias de transplante (Figura 52).

Figura 52 - Fotomicrografias e análise da média de SSCs caninas GFP+ encontradas nos testículos camundongos receptores, 70 dias após o transplante

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: (A) e (B) células GFP+ no testículo dos camundongos receptores. (A) animais com células germinativas tratadas com FSH *in vitro*. (B) animais com células germinativas não tratadas (controle). (C) Diferença estatística significativa. Teste *t* não pareado (**p*<0,05).

6.6.4.3.3 Análise de PCR para DNA α -satellite Canino

O DNA extraído do epidídimo dos camundongos receptores foi analisado por PCR utilizando primers específicos para DNA α -satellite canino, por meio do gel de agarose visualizamos duas amostras de camundongos receptores positivas para o primer canino. Não houve amplificação do DNA dos controle negativo. Portanto, os camundongos que tiveram amplificação do DNA canino foi os que receberam as células germinativas dos cães adultos e as células caninas que foram tratadas com FSH *in vitro*, portanto visualizamos a amplificação da banda com 324pb no gel de agarose 1,5% (Figura 53).

Figura 53 - Análise de PCR do gene DNA α -satélite canino no epidídimo dos camundongos receptores

Fonte: (PIERI, N.C.G, 2016).

Legenda: Detecção do DNA -satélite no epidídimo camundongo receptor. (A) Linha 1: 1,200 pb; linha 2 DNA canino (controle positivo); Linha 3: camundongo que receberam células de cães pré-púberes; Linha 4 e 5: camundongos que receberam as células de cães tratadas com FSH; Linha 6 e 7: camundongos que receberam as células de cães adultos e linha 8: DNA de camundongos (controle negativo).

6.6.5 Discussão e Conclusão

A técnica para promover o ensaio funcional *in vivo* das células tronco espermatogônias, tem sido utilizado para distinguir defeitos causados pela função intrínseca das espermatogônias tronco e do ambiente extrínseco, para a produção de animais transgênicos a fim de restaurar a fertilidade (OWAGA et al., 2000; ZHONI et al., 2001) assim, neste experimento transplantamos células germinativas caninas com a finalidade de compreender o mecanismo da espermatogênese e promover aplicação na conservação das espécies em extinção, e animais valiosos para a pesquisa.

Foram realizados ensaios funcionais das células germinativas caninas, para identificar as SSCs e avaliar se o cultivo e purificação destas células era satisfatório, de acordo com Kubota et al. (2011) este ensaio em coelhos foi eficiente, demonstrado que as células germinativas do coelho tem habilidade para formar pequenas colônias após o transplante e apresentam potencial de SSCs, entretanto o ensaio para avaliar a diferenciação em espermatozoides e autorenovação das SSCs dos coelhos ainda não foi estabelecido, da mesma forma que com as SSCs caninas.

A colonização dos túbulos seminíferos dos camundongos ocorre em três fases: migração para a membrana basal durante 1^o semana, proliferação das SSCs ao longo da

membrana basal durante a 2ª semana e início da espermatogênese pós 1º mês do transplante (NAGANO et al., 1999), portanto neste experimento os camundongos receptores foram mantidos por 25, 70 e 90 dias para avaliarmos as fases de colonização das células germinativas caninas, uma vez que a duração da espermatogênese no camundongo é de 35 dias e no cão de em média 60 dias (RUSSEL et al., 1990; SOARES et al., 2009).

Nagano et al. (1999) mencionam que quando realizamos o transplante de células tronco germinativa, cada colônia produz uma célula tronco e que apenas 10% das células tronco transplantadas podem colonizar o testículo receptor. Portanto, o mesmo número de células germinativas caninas (10^5) foi injetado em cada testículo receptor, e o número de colônias geradas no camundongo é reflexo da concentração de célula, entretanto no experimento dos camundongos transplantados com células GFP+, obtivemos um número superior de colônias do que nos animais que receberam células LacZ+, isto pode estar ligado à eficiência da transfecção e transdução dos lentivirus.

A injeção de 10^8 /ml de suspensão de células testiculares e 10 µl desta suspensão celular no túbulo seminífero do animal receptor, promove o transplante de aproximadamente 10^6 células no interior do lúmen dos túbulos (OWAGA et al., 1997), entretanto Meistrich e Van Beeck (1993) menciona que em 10^4 de células testiculares contém em média 2 células tronco, assim neste experimento 20 células tronco foram introduzidas no túbulo seminífero dos camundongos receptores, com aproximadamente formação de 8 colônias.

No presente estudo as células germinativas caninas foram transduzidas com dois genes reporter LacZ e GFP, obteve-se sucesso no transplante das células transduzidas com GFP, diferentemente Kubota et al. (2011) que descreve o sucesso na eficiência da expressão dos dois genes reporter, entretanto em menor expressão.

As células transfectadas com LacZ não foram identificadas nos animais receptores em nenhum dos períodos avaliados, diferentes Owaga et al. (1997) descrevem que as células LacZ+ foram visualizadas nos camundongos receptores 70 e 140 dias pós transplante. De acordo com os autores, espermatídes arredondas e células germinativas diferenciadas podem ser coradas com X-gal, entretanto as células germinativas endógenas não foram coradas.

Ao avaliar camundongo receptor 5 dias pós o transplante notou-se células coradas com 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal) no lúmen dos túbulos seminíferos, da mesma forma, Nagano et al. (1999) mencionam que camundongos receptores pós 1 dia e 1 semana de transplante poucas células do doador podem ser encontradas na membrana basal e muitas mantinham-se dispersas ao longo dos túbulos seminíferos.

As células germinativas caninas (GFP+), foram identificadas na membrana basal dos túbulos após o transplante, indicando a presença de SSCs funcionais na população transplantada, da mesma forma que Izardyar et al. (2011) purificou uma população de espermatogoniais por meio do sorting magnético (SSEA+) e transplantou nos camundongos, segundo os autores as células SSEA+ humana encontravam-se na membrana basal dos túbulos seminíferos dos animais receptores.

Kubota et al. (2011) ao avaliarem o transplante das células germinativas de coelho afirmam que a continua habilidade de proliferação na membrana basal nos túbulos seminíferos do camundongo receptor, por meio da formação de nicho de SSCs e a proliferação antigênica é uma grande evidência de que estas células são SSCs, igualmente observado nas células germinativas caninas transplantadas nos camundongos receptores, portanto podemos citar que as células transplantadas são SSCs caninas.

Dobrinski et al. (1999) (2000) citam que as células germinativas do coelho, cão e do porco podem colonizar o túbulo seminífero do camundongo, entretanto estas células não diferenciam além do estágio espermatogonial, igualmente observado nos camundongos receptores deste estudo. O número colônias de células germinativas caninas GFP+ nos camundongos receptores, apresentaram diferenças, sendo que com 25 dias notamos maior porcentagem de colônias, diferentemente dos mencionado por Kanatsu-shinoara et al. (2003) que identificaram maior número de colônias com 4 meses pós transplante. Entretanto, aos 90 dias encontramos nos túbulos seminíferos dos camundongos receptores, um maior número de células germinativas caninas GFP+ quando comparamos com os demais períodos avaliados.

Neste estudo, foi avaliado o tempo que as células germinativas caninas, poderiam ser encontradas no túbulo seminífero do animal receptor, a influência da idade dos animais doadores e da adição de fatores hormonais adicionados *in vitro* nestas células, para que tivemos o sucesso do xenotransplante nestes animais, de acordo com o descrito por Arregui e Dobrinski (2015) estes são alguns dos fatores que podem influenciar o sucesso do xenotransplante em mamíferos. Portanto, nos animais receptores transplantados com células germinativas de cães pre-púberes tratadas inicialmente *in vitro* com FSH apresentaram o maior número de células GFP+ no túbulo seminífero, demonstrando que estas células teriam um melhor potencial para o sucesso do xenotransplante.

Abrishami; Abbasi e Honaramooz (2010) realizaram um estudo com xenoenxerto de testículo de cães em camundongos tratados com FSH e LH e avaliaram se a idade do doador influenciava o sucesso do transplante, de acordo com os autores 4 meses após o transplante os camundongos que receberam as células de cães imaturos e jovens (<4, 4 a 6 meses de idade),

tinham uma maior taxa de recuperação da espermatogênese, peso do enxerto, índice glândula vesicular, número e diâmetro dos túbulos seminíferos do que os que receberam as células dos animais adultos, neste estudo diferentemente do descrito pelo autores supracitados realizamos o xenotransplante diretamente no testículos, entretanto resultados semelhante foram obtidos, o qual a melhor taxa de proliferação foi com células de cães pré-púberes. Portanto este grupo de idade de doadores seria o mais promissor para atingir a taxa de restauração da espermatogênese e a produção de espermatozoides no camundongo receptor quando comparado com as demais idades avaliadas.

Muitos fatores de crescimento, hormonais e de interação das células tronco e de Sertoli regulam o processo espermatogênico e estes podem influenciar o xenotransplante (ARREIGUI; DOBRINSKI, 2015; KOJIMA et al., 1997). As células germinativas caninas foram tratadas com FSH *in vitro* e transplantadas nos camundongos receptores, após 70 dias de transplante estes apresentaram uma maior porcentagem de células e túbulos seminífero positivos. Hadi Anjamrooz et al. (2006) fez um ensaio de xenotransplante de células tratadas com epitelial fator de crescimento (EGF) *in vitro*, o qual foi selecionado por ter apresentado o melhor fator colonizador em cultivo, e após o transplante este mostrou um aumento do número de espermatozoides no lúmen do epidídimo esquerdo dos camundongos receptores em comparação com os grupos de controle.

Dobrisnki et al. (1999) realizaram o primeiro ensaio de xetransplante com células germinativas caninas em camundongos, e uso o método para a detecção de DNA canino por PCR. Eles demonstraram por meio desta técnica adetecção de uma célula de cão em em 10^6 células de camundongo analisadas. Neste estudo, realizamos a técnica de detecção de DNA canino, da mesma forma que descrito pelos pelos autores supracitados, entretanto, diferentemente avaliamos o epidídimo dos camundongos receptores. Assim, neste experimento foram detectados DNA de cão em dois camundongos, embora seja um que recebeu células germinativa de cão adulto e um com células germinativas tratadas com FSH *in vitro* antes do transplante.

Portanto, nestes experimentos de xenotransplante demonstramos que as células SSCs mantêm-se nos testículos dos camundongos tratados com Busulfan por longos períodos, isto é possível, pois o testículo é um órgão imune-privilegiado pela barreira hematotesticular (BTB), a qual é formada pelas células de Sertoli, que promove proteção autoimunogenetica dos espermatozoides dos ataques do sistema imune. E alguns estudos tem reportado que a células de Leyding, Sertoli e macrófagos testiculares tem atividade imunossupressora que inibem a proliferação de linfócitos. Assim, as células testiculares fora da BTB, como espermatogônias,

são também protegidas pelas inflamações autoimunes (HEAD; BILLINGHAM, 1982; POLLANEN; MADDOCKS, 1988; ITOH et al., 2005). Qu et al. (2012) mencionam que por estas razões, o privilégio autoimune do testículo permite o transplante xenogênico de SSCs, e estas podem diferenciar em algum grau em camundongos receptores imunocompetentes.

Nossos resultados demonstraram que as células germinativas de cães pré-púberes tratadas com FSH *in vitro* podem colonizar os túbulos seminíferos dos camundongos receptores e mantem-se vivas na membrana basal até 90 dias após transplante, mesmo que estes animais tenham uma distância filogenética e uma variedade de idades e raças, como mencionado por Dobrinski et al. (1999; 2000); Nagano et al. (2001) e Kim et al. (2006). Portanto a colonização dos túbulos seminíferos nos camundongos receptores pode estar ligada a interação entre as células de Sertoli e estágios iniciais das células germinativas, as quais suportam a proliferação das espermatogoniais que são parcialmente conservadas entre as espécies (DOBRINSKI et al., 2000). O DNA canino encontrado no epidídimo de dois camundongos receptores é primeiro passo para que tenhamos o sucesso do xenotransplante entre estas espécies, uma vez que isto nunca foi mencionado na literatura. Embora, DNA encontrado ainda tem que ser investigado, uma vez que pode ser uma vesícula liberada do testículo ou espermatozoide. Contudo, os experimentos de xenotransplante realizados nesta pesquisa podem oferecer uma opção viável para o transplante das células germinativas caninas e o estudo da espermatogênese dos canídeos, e com estas novas descobertas poderemos ter o sucesso do xenotransplante e assim oferecer uma nova opção para o estudo e tratamento da infertilidade por meio da criação de um modelo viável *in vivo*.

CONCLUSÃO GERAL

7 CONCLUSÃO GERAL

O sucesso do xenotransplante está relacionado a vários fatores, sendo eles: preparação do recipiente (BRINSTER et al., 2003), condições favoráveis para o transplante, remoção das células endógenas por métodos citotóxicos (Busulfan) e a idade do animal doador. Nesta pesquisa foram realizados ensaios para estabelecer estes parâmetros, afim de promover o sucesso do xenotransplante das células germinativas caninas nos camundongos receptores.

Portanto, com os experimentos realizados e métodos propostos, segue as seguintes conclusões:

- ✓ Os experimentos de diferenciação das células embrionárias caninas (EGCs) demonstraram que estas células apresentam uma alta proliferação celular, no período de uma semana em cultivo, imunofenotipicamente são positivas para marcadores de células germinativas adultas após o tratamento com ATRA, em um curto período de tempo (3-10 dias) expressam os genes *DAZL* e *STRA8*;
- ✓ Enriquecimento e a adição de fatores de crescimento e o cultivo sobre uma monocamada de fibroblastos embrionários caninos, são essenciais para se obter uma população mais pura de SSCs caninas. Aos 10 dias de cultivo as células germinativas adultas apresentam expressão de CD49f, CD117, e com 5 dias uma expressão semelhante de GFRA1 e *DAZL*, nos cães pré-púberes, sugerindo este o melhor período para a realização dos experimentos de xenotransplante e indicando a presença de SSCs (espermatogoniais tipo A);
- ✓ Células germinativas do testículo canino pré-púberes, púberes e adultos têm imunocompatibilidade com PLZF, GFRA1, OCT4, C-kit, *STRA8* e *DAZL*. Cerca de 15 a 22% de células germinativas expressam OCT4 indicando a presença da população de SSCs com característica de pluripotência nos testículos de cães pré-púberes e adultos. Além disso, a técnica de imunohistoquímica revelou que GFRA1, *DAZL*, PLZF são expressos em células tronco espermatogônias em todas as faixas etárias, demonstrando que estas proteínas participam do desenvolvimento inicial reprodutivo e mantém-se na por todo o processo espermatogênico;

- ✓ A adição de FSH *in vitro* promove um aumento da proliferação e autorrenovação das espermatogônias caninas (GFRA1+), por um período de 5 dias em cultivo;
- ✓ O ensaio do tempo de ação do Busulfan na espermatogênese dos camundongos receptor (C57Bl/6) mostrou que dose de 45mg/kg, promove mudanças morfológica nos testículos de 4 e 6 semanas. E o período de 6 semanas pós tratamento com o quimioterápico Busulfan nos camundongos C57Bl/6, é o período mais indicado para injeção das células do animal doador;
- ✓ Com a forma de purificação correta é possível obter população de SSCs caninas a partir das células germinativas, as quais colonizaram os túbulos seminíferos dos camundongos imunodeficientes e foram capazes de manter-se vivas na membrana basal por 90 dias após transplante, mesmo que estes animais tenham distância filogenética;
- ✓ Células germinativas de cães pré-púberes apresentam maior potencial para o restabelecimento da espermatogênese em xenotransplantes, quando comparada com outras idades reprodutivas;
- ✓ Células germinativas caninas tratadas com FSH apresentam maior número de células GFP positivas no túbulo seminífero do animal receptor após 70 dias do transplante;
- ✓ Avaliação por meio da detecção de DNA no epidídimo dos camundongos receptores revelou a detecção do DNA canino em dois camundongos após 70 dias, sendo no epidídimo dos camundongos transplantados com células germinativas caninas tratadas com FSH *in vitro* e células de cães adultos, sugerindo que é possível o sucesso do xenotransplante entre estas duas espécies.

Contudo, por meio dos experimentos realizados nesta pesquisa, podemos responder a hipótese proposta inicialmente. As células tratadas com FSH *in vitro* dos cães pré-púberes apresentam um maior potencial para o restabelecimento da espermatogênese em animais

inférteis e podem ser utilizadas como foco em estudos futuros de infertilidade. Pois, é possível identificar as células germinativas dos cães nos camundongos receptores após 90 dias do transplante. Assim, os resultados descritos podem ser utilizados como base para novos estudos de xenotransplante entre cães e camundongos, uma vez que os muitos mecanismos da espermatogênese ainda precisam ser desvendados e melhor compreendidos em canídeos. Nossos achados possibilitam o sucesso do xenotransplante e a possível criação de um modelo economicamente viável e próximo do humano que ofereça novos *insights* para o tratamento da infertilidade com o uso de células tronco germinativas em animais domésticos e silvestres.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBASI, H.; TAHMOORESPUR, M.; HOSSEINI, S.M.; NASIRI, Z.; BAHADORANI, M.; HAJIAN, M.; NASIRI, M.R.; NASR-ESFAHANI, M.H. THY1 as a reliable marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in the goat. **Theriogenology**, v.80, n.8, p.923-32, Nov.2013.
- ABRISHAMI, M.; ABBASI, S.; HONARAMOOZ, A. The effect of donor age on progression of spermatogenesis in canine testicular tissue after xenografting into immunodeficient mice. **Theriogenology**, v.73, n.4, p.512-22. Mar.2010.
- ACLAND, G.M.; AGUIRRE, G.D.; BENNETT, J.; ALEMAN, T.S.; CIDECIYAN, A.V.; BENNICELLI, J.; DEJNEKA, N.; PEARCE-KELLING, S.E.; MAGUIRE, A.M.; PALCZEWSKI, K. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. **Molecular Therapy**, v.12, n.6, p.1072-82, Dec.2005.
- AHMAD, S.; XIAO, Y.; HAN, L.; HUA, H.; RIAZ, H.; LIANG, A.; YAN, L.G. Isolation, identification and enrichment of type a spermatogonia from the testis of Chinese cross-bred buffaloes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, n.2, p. 373–381, Jun.2013.
- ALMIRON, I.; DOMENE, H.; CHEMES, H.E. The hormonal regulation of premeiotic steps of spermatogenesis in the newborn rat. **Journal of Andrology**, v. 5, n.4, p.235-242, Jul-Aug.1984.
- ANDERSON A, COPEL TK, SCHOLER H, HEASMAN J & WYLIE C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. **Mechanism of Development**, v.91, n.5, p.61–68, Mar.2000.
- ANDERSON, E.L.; BALTUS, A.E.; ROEPERS-GAJADIEN, H.L.; HASSOLD, T.J.; DE ROOIJ, D.G.; VAN PELT, A.M.; PAGE, D.C. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.39, p.14976-80, Sep.2008.
- ANJAMROOZ, S.H.; MOVAHEDIN, M.; MOWLA, S.J.; BAIRANVAND, S.P. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following Busulfan treatment. **Iranian Biomedical Journal**, v.11, n.1, p.15-22. Jan. 2007.
- ANJAMROOZ, S.H.; MOVAHEDIN, M.; TIRAIHI, T.; MOWLA, S.J. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. **Journal Reproduction Fertility**, v.18, n.6, p.709-20, Dev. 2006.
- ANJAMROOZ, S.H.; MOVAHEDIN, M.; TIRAIHI, T.; MOWLA, S.J. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. **Reproduction Fertility Development**, v.8, n.6, p.709-20, 2006.

APONTE, P.M.; SODA, T.; VAN DE KANT, H.J.; DE ROOIJ, D.G.; Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. **Theriogenology**, v.65, n.9, p.1828-47, Jun.2006.

ARREGUI, L.; DOBRINSKI, I. Xenografting of testicular tissue pieces: 12 years of an in vivo spermatogenesis system. **Reproduction**, v.148, n.5, p. R71-84. Nov.2014.

ATHANASIOU, K.A.; AGARWAL, A.; MUFFOLETTO, A.; DZIDA, F.J.; CONSTANTINIDES, G.; CLEM, M. Biomechanical properties of hip cartilage in experimental animal models. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.316, p.254-66. Jul.1995.

AVILION, A.A.; NICOLIS, S.K.; PEVNY, L.H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2. function. **Genes & Development**, v.17, n.1, p.126-40, Jan.2003.

BAAZM, M.; ABOLHASSANI, F.; ABBASI, M.; HABIBI ROUDKENAR, M.; AMIDI, F.; BEYER, C. An improved protocol for isolation and culturing of mouse spermatogonial stem cells **Cellular Reprogramming**, v.15, n.4, 3329-36, Aug.2013.

BACHA, J.R. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 457p.

BHATTACHARYA, I.; PRADHAN, B.S.; SARDA, K.; GAUTAM, M.; BASU S.; MAJUMDAR, S.S. A. Switch in Sertoli cell responsiveness to FSH may be responsible for robust onset of germ cell differentiation during prepubertal testicular maturation in rats. **American Journal of Physiology**, v.303, n.7, p. E886-98, Nov.2012.

BALTUS, A.E.; MENKE, D.B.; HU, Y.C.; GOODHEART, M.L.; CARPENTER, A.E.; DE ROOIJ, D.G.; PAGE, D.C. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. **Nature Genetics**, v.38, n.12, p.1430-4, Dec 2006.

BEAVER, B.V. Mating behavior in the dog. **Veterinary of Clinical North America**, v. 7, p. 723- 728, 1977.

BELLAÏCHE, J.; GOUPIL, A.S.; SAMBRONI, E.; LAREYRE, J.J.; LE, G.A.C. F. Gdnf-Gfra1 pathway is expressed in a spermatogenic-dependent manner and is regulated by fish in a fish testis. **Biology of Reproduction**, v.91, n.4, p.94. Oct.2014.

BELLVE, A.R.; CAVICCHIA, J.C.; MILLETTE, C.F.; O'BRIEN, D.A.; BHATNAGAR, Y.M.; DYM, M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. **Journal Cellular Biology**, v.74, n.1, p.68-85. Jul.1977.

BHARTIYA, D.; KASIVISWANATHAN, S.; UNNI, S.K.; PETHE, P.; DHABALIA, J.V.; PTWARDHAN, S.; TONGAONKAR, H.B. Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 58, n.12, p.1093-106, Dec.2010.

BISHOP, J.B.; WASSOM, J.S. Toxicological review of Busulfan (Myleran). **Mutation Research**, v. 168, n.1, p.15-45. Jul. 1986.

BÖCKERS, T.M.; NIESCHLAG, E.; KREUTZ, M.R. BERGMANN, M. Localization of follicle-stimulating hormone (FSH) immunoreactivity and hormone receptor mRNA in testicular tissue of infertile men. **Cell Tissue Research**, v.278, n.3, p.595-600, Dec. 1994.

BOUSFIELD, G.R.; J.I.A.; WARD, D.N. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. In: KNOBIL, A.; NEILL'S. **Physiology of Reproduction**, 3. ed, Eds JD Neill. Elsevier Academic Press, p.1581-1634, 2006.

BOYER, T.R.; ERICKSON, R.P. Detection of circular and linear transcripts of Sry in pre-implantation mouse embryos: differences in requirements for reverse transcriptase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.198, n.2, p. 492–496, Jan.1994.

BRESSAN, F.F.; MIRANDA, M. S. de Bem, T.H; PEREIRA, F. T. V.; BINELLI, Mário; MEIRELLES, F. V. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (Impresso), v. 32, p. 240-250, 2008.

BRESSAN, F. F. **Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência**. 2013. Tese apresentada no programa de pós-graduação- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2013.

BRESSAN, F. F.; MIRANDA, M. S.; BAJGELMAN, M. C.;PERECIN, F.; MESQUITA, L. G. ; FANTINATO-NETO, P. ; MERIGHE, G. F. K. ; STRAUSS, B. E. ; Meirelles, F. V. . Effects of long-term in vitro culturing of transgenic bovine donor fibroblasts on cell viability and in vitro developmental potential after nuclear transfer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal (Print)**, v. 49, p. 250-259, 2013.

BRINSTER, C.J.; RYU, B.Y.; AVARBOCK, M.R.; KARAGENC, L.; BRINSTER, R.L.; ORWIG, K.E. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. **Biology of Reproduction**, v.69, n.2, p.412-20. Apr. 2003.

BRINSTER, R.L. Germ line stem cell transplantation and transgenesis. **Science**, v.296, n.5576, p.2174-6. Jun. 2002.

BRINSTER, R.L.; AVARBOCK, M.R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p. 11303–11307. Nov.2004.

BRINSTER, R.L.; AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, n.24, p.11303-7, Nov.1994.

BRINSTER, R.L.; ZIMMERMAN, J.W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, n.24, p.11298-302. Nov.1994.

BRISHAMI, M.; ABBASI, S.; HONARAMOOZ, A. The effect of donor age on progression of spermatogenesis in canine testicular tissue after xenografting into immunodeficient mice **Theriogenology**, v.73, n.4, p.512–522, Mar.2010.

BUAAS, F.W.; KIRSH, A.L.; SHARMA, M.; MCLEAN, D.J.; MORRIS, J.L.; GRISWOLD, M.D.; DE ROOIJ, D.G.; BRAUN, R.E.; Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. **Nature Genetics**, v.36, n.6, p.647-52, Jun. 2004.

BUAGEAW, A.; SUKHWANI, M.; BEN-YEHUDAH, A.; EHMCKE, J.; RAWE, V.Y.; PHOLPRAMOO, C.; ORWIG, K.E.; SCHLATT, S. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. **Biology of Reproduction**, v.73, n.5, p.1011–1016. Nov.2005.

BUCCI, L.R.; MEISTRICH, M.L. Effects of Busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. **Mutation Research**, v.176, p.259-268, Feb.1987.

CAI, H.; XIA, X.; WANG, L.; LIU, Y.; HE, Z.; GUO, Q.; XU, C. In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.433, n.3, p.286-91, Apr. 2013.

CAIRES, K.; BROADY, J.; MCLEAN, D. Maintaining the male germ line: regulation of spermatogonial stem cells. **Journal of Endocrinology**, v.205, n.2, p.133-45, May. 2010.

CAMPOS-JUNIOR, P.H.; COSTA, G.M.; LACERDA, S.M.; REZENDE-NETO, J.V.; DE PAULA, A.M.; HOFMANN, M.C.; DE FRANÇA, L.R. The Spermatogonial Stem Cell Niche in the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). **Biology of Reproduction**, v. 86, n.5, p.1-10, May.2012.

CASTRO, A.C.S.; BERNEDSON, W.E.; CARDOSO, F.M. Kinetics and quantification of spermatogenesis: morphological basis its application in studies of mammalian reproduction. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.21, n.1, p.25 – 34. 1997.

CHAMBERS, I.; SILVA, J.; COLBY, D.; NICHOLS, J.; NIJMEIJER, B.; ROBERTSON, M.; VRANA, J.; JONES, K.; GROTEWOLD, L.; SMITH, A. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. **Nature**, v.450, n.7173, p.1230-4. Dec.2007.

CHAMBON, P.; FASEB, J. Cells and HLA antigens in the human testis. **International Journal of Andrology**, v.10, n.1, p.37–42, Feb.1987.

CHEMES, H.E.; DYM, M.; RAJ, H.G.M. The role of gonadotrophins and testosterone on initiation of spermatogenesis in the immature rat. **Biology of Reproduction**, v. 21, n.1, p.241-249, Aug.1979.

CHEN, S.R.; LIU, X.Y. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. **Reproduction**, v.149, n.4, p.159-67, Apr. 2015.

CHI, H.; CHUN, K.; SON, H.; KIM, J.; KIM, G.; ROH, S. Effect of genistein administration on the recovery of spermatogenesis in the Busulfan-treated rat testis. **Clinical Experimental Reproduction Medicine**, v.40, n.2, p.60-6. Jun.2013.

CHIARINI-GARCIA, H.; RAYMER, A.M.; RUSSELL, L.D. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. **Reproduction**, v.126, n.5, p.669-80. Nov.2003.

CHILDS, A.J.; COWAN, G.; KINNELL, H.L.; ANDERSON, R.A.; SAUNDERS, P.T. Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. **PLoS One**, v.6, n.6, p. e20249, Jun. 2011.

CLARK, L.A.; TSAI, K.L.; STEINER, J.M.; WILLIAMS, D.A.; GUERRA, T.; OSTRANDER, E.A.; GALIBERT, F.; MURPHY, K.E. Chromosome-specific microsatellite multiplex sets for linkage studies in the domestic dog. **Genomics**, v.84, n.3, p.550-4. Sep 2004.

CLARK, A.T.; BODNAR, M.S.; FOX, M.; RODRIQUEZ, R.T.; ABEYTA, M.J.; FIRPO, M.T.; PERA, R.A. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. **Human Molecular Genetics**, v.13, n.7, p.727-39, Apr. 2004.

CLOUTHIER, D.E.; AVARBOCK, M.R.; MAIKA, S.D.; HAMMER, R.E.; BRINSTER, R.L. Rat spermatogenesis in mouse testis. **Nature**, v.381, n.6581, p.418-21. May.1996.

CONRAD, S.; RENNINGER, M.; HENNENLOTTER, J.; WIESNER, T.; JUST, L.; BONIN, M.; AICHER, W.; BÜHRING, H.J.; MATTHEUS, U.; MACK, A.; WAGNER, H.J.; MINGER, S.; MATZKIES, M.; REPEL, M.; HESCHELER, J.; SIEVERT, K.D.; STENZL, A.; SKUTELLA, T. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. **Nature**. v.456, n.7220, p.344-9, Nov.2008.

COSTA, G.M.; AVELAR, G.F.; REZENDE-NETO, J.V.; CAMPOS-JUNIOR, P.H.; LACERDA, S.M.; ANDRADE, B.S.; THOMÉ, R.G.; HOFMANN, M.C.; FRANCA, L.R. Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. **PLoS One**, v.7, n.8, p.44091, Aug.2012.

COSTOYA, J.A.; HOBBS, R.M.; BARNA, M.; CATTORETTI, G.; MANOVA, K.; SUKHWANI, M.; ORWIG, K.E.; WOLGEMUTH, D.J.; PANDOLFI, P.P. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. **Nature Genetics**, v.36, n.6, p.653-9, Jan.2004.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON AD, GOMES WR, VANDEMARK NL. (ed). **The testis**. New York: Academic Press, n.1, p.339-432, 1970.

CREEMERS, L.B.; DEN OUDEN, K.; AMM, V.P.; DE ROOIJ, D.J. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. **Reproduction**.v.124, n.6, p.791-9, Dec 2002.

DANN, C.T.; ALVARADO, A.L.; MOLYNEUX, L.A.; DENARD, B.S.; GARBERS, D.L.; PORTEUS, M.H. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor

downregulated during retinoic acid-induced differentiation. **Stem Cells**, v.26, n.11, p.2928-37. Nov.2008.

DE BARROS, F.R.; WORST, R.A.; SAURIN, G.C.; MENDES, C.M.; ASSUMPÇÃO, M.E.; VISINTIN, J.A. α -6 integrin expression in bovine spermatogonial cells purified by discontinuous Percoll density gradient. **Reproduction Domestic Animals**, v. 47, n.6, p.887-90, Dec. 2012.

DE CESARIS P, FILIPPINI A, CERVELLI C, RICCIOLI A, MUCI S, STARACE G, STEFANINI M, ZIPARO E. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research**, 186:1639-1646.1992.

DE KRETZER, D.M.; KERR, J.B. **In the Physiology of Reproduction**, eds. Knobil, E. & Neill, J.D. Raven, New York, 2nd Ed, 1994, 1177-1290p.

DE ROOIJ, D.G, RUSSELL, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**, v.21, p.776–98. Sep.2000.

De ROOIJ, D.G. DE, KRAMER, M.F. The effect of three alkylating agents on the seminiferous epithelium of rodents, I. Depletory effect, **Virchows Arch Abt B Zellpathol**, v. 4, p. 267-275. Dec.1970.

De ROOIJ, D.G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. **Reproduction**. v.21, n.3, p.347-54, Mar.2001.

DESJARDINS, C.; EWING, L.L. **Cell and Molecular Biology of the Testis**. New York: Oxford University Press. 1993, 296-331p.

DETTIN, L. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. **Biology of Reproduction**, v. 69, n.5, p.1565–1571, Nov.2003.

DING, L.J.; YAN, G.J.; GE, Q.Y.; YU, F.; ZHAO, X.; DIAO, Z.Y.; WANG, Z.Q.; YANG, Z.Z.; SUN, H.X.; HU, Y.L. FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. **FEBS Lett**, v.585, n.15, p.2437-44, Aug.2011.

DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. Animal Reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.137-45, Oct.2005.

DOBRINSKI, I.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. **Biology of Reproduction**, v.61, n.5, p.1331-9. Nov.1999.

DOBRINSKI, I. Transplantation of germ line stem cells for the study and manipulation of spermatogenesis. **Ernst Schering Res Found Workshop**, v.60, p.175-93, 2006.

DOLCI, S.; PELLEGRINI, M.; DI AGOSTINO, S.; GEREMIA, R.; ROSSI, P. Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.43, p.40225-33, Oct. 2001.

DONOVAN, P. J.; DE MIGUEL, M. P. Turning germ cells into stem cells. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.13, n.5, p. 463-471. Dev.2003.

DUNN, C.D.R. Chemical and biological properties of Busulfan. **Experimental Hematology**, v.2, n.3, p.101-107, Oct.1974.

DUNN, C.D.R.; ELSON, L.A. The effect of a homologous series of dimethane-sulphonoxy-alkanes on haernopoietic colony forming units in the rat. **Chemico-Biological Interactions**, v.2, p. 273-280, Nov.1970.

DURCOVA-HILLS, G., AINSCOUGH, J.; MCLAREN, A. Pluripotentialstem cells derived from migrating primordial germ cells. **Differentiation**, v. 68, n.4-5, p.220-226, Oct.2001.

DYCE, K. M.; SACK, W.O.; WENSING, C. J. G. Tratado de Anatomia Veterinária. Rio de

DYM M, FAWCETT, D.W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. **Biology of Reproduction**, v.3, p.308-326.1970.

EBATA, K.T.; ZHANG, X.; NAGANO, M.C. Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. **Molecular Reproduction Development**, v. 72, n.2, p.171–81, Nov.2005.

EILDERMANN, K.; GROMOLL, J.; BEHR, R. Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture. **Human Reproduction**, v.27, n.6, p.1754-67. Jun. 2012.

ENDO, T.; ROMER, K.A.; ANDERSON, E.L.; BALTUS, A.E.; DE ROOIJ, D.G.; PAGE, D.C. Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.112, n.18, p.E2347-56, May.2015.

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V.; HEIDGER, P.M. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal Reproduction Fertility Supplement**, v.10, p.105-122.1970.

FENG, C.W.; BOWLES, J.; KOOPMAN, P. Control of mammalian germ cell entry into meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.382, n.1, p.488-97, Jan.2014.

FERDER, I.C.; WANG, N. Hypermaintenance and hypofunction of aged spermatogonia : insight from age-related increase of Plzf expression. **Oncotarget**, v.6, n.18, p. 15891-901, Jun.2015.

FEITOSA, M.L.T.; FADEL, L.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; WENCESLAU, C.V.; KERKIS, I.; KERKIS,A.; BIRGEL, JÚNIOR,E.H.; MARTINS,J.F.P.; MARTINS, D.S.; MIGLINO,M.A.; AMBRÓSIO, C.E. Transplante bem sucedido de células estaminais mesenquimais em osteonecrose induzida da cabeça femoral ovinos.**Acta Cirurgica. Brasileria**. v.25 n.5, 2010.

FIJAK, M.; MEINHARDT, A. The testis in immune privilege. **Immunological Reviews**, v.213, p.66-81, Oct. 2006.

FILIPPONI, D.; HOBBS, R.M.; OTTOLENGHI, S.; ROSSI, P.; JANNINI, E.A.; PANDOLFI, P.P.; DOLCI, S. Repression of kit expression by Plzf in germ cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n.19, p. 6770–6781, Oct.2007.

FITCHEN, J.H.; CLINE, M.J. The effect of granulopoietic stress in mice with "latent" bone marrow failure. **Experimental Hematology**, v.8, n.6, p.788-94. Jul 1980.

FIX, C.; JORDAN, C.; CANO, P.; WALKER, W.H. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.30, p. 10919–10924, Jul.2004.

FORRESTER JV, XU H, LAMBE T, CORNALL R. Immune privilege or privileged immunity? **Mucosal Immunology**, v.1, p.372-381. Jul.2008.

FRANÇA, M.R. **Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose no endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos de corte**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FRÖJDMAN, K.; PELLINIEMI, L. J. Differential distribution of the alpha 6 subunits of integrins in the development and sexual differentiation of the mouse testis. **Differentiation**. v.57, n.1, p.21-9, Jun.1994.

GALTON, D.A.G. Myleran in treatment of chronic myeloid leukemia. **Journal Medical B**, v.1, p.208-213, Apr.1953.

GASSEI, K.; EHMCKE, J.; DHIR, R.; SCHLATT, S. Magnetic activated cell sorting allows isolation of spermatogonia from adult primate testes and reveals distinct GFRa1-positive subpopulations in men. **Journal of Medical Primatology**, 39, n.2, p.83–91, Apr.2010.

GASSEI, K.; ORWIG, K.E. SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. **Plos One**, v. 8, n.1, p. E53976, Jan.2013.

GEBHART, E.; SCHWANITZ, G.; HARTWICH, H. Chromosome changes in Myleran therapy. **Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med**, v.79, p. 1389-1391, 1973.

GEIJSEN, N.; HOROSCHAK, M.; KIM, K.; GRIBNAU, J.K.; EGGAN DALEY, G.Q. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. **Nature**. v.427, n.6970, p.148-54, Jan.2004.

GIESE, S.; HOSSAIN, H.; MARKMANN, M.; CHAKRABORTY, T.; TCHATALBACHEV, S.; GUILLOU, F.; BERGMANN, M.; FAILING, K.; WEIDER, K.; BREHM, R. Sertoli-cell-specific knockout of connexin 43 leads to multiple alterations in testicular gene expression in prepubertal mice. **Disease Models & Mechanisms**, v.5, n.6, p.895–913, Nov.2012.

GINSBURG, M.; SNOW, M.H.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v.110, n.2, p.521-8, Oct.1990.

GOEL, S.; REDDY, N.; MANDAL, S.; FUJIHARA, M.; KIM, S.M.; IMAI, H. GOLESTANEH, N.; KOKKINAKI, M.; PANT, D.; JIANG, J.; DESTEFANO, D.; FERNANDEZ-BUENO, C.; RONE, J.D.; HADDAD, B.R.; GALLICANO, G.I.; DYM, M. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. **Stem Cells Development**, v.18, n.8, p.1115-26. Oct.2009.

GOEL, SANDEEP, REDDY, NIRANJAN, MANDAL, SUMAN, FUJIHARA, MAYAKO, KIM, SUNG-MIN, IMAI, HIROSHI. Spermatogonia-specific proteins expressed in prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia. **Theriogenology**, v.74, p. 1221–1232. 2010.

GRASSO, M.; FUSO, A.; DOVERE, L.; DE ROOIJ, D.G.; STEFANINI, M.; BOITANI, C.; VICINI, E. Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis. **Reproduction**, v.143, n.3, p. 325-32, Mar.2012.

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

HADJANTONAKIS, A.K.; PAPAIOANNOU, V.E. Stem cells of early embryos- Reweir. **Differentiation**, v.68, n.4-5, p.159-66. Oct. 2001.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2003, 530p.

HALPERN, B. Immunosuppressive substances and their mechanism of action. **Excerpta Medica International Congress**, v.232, p. 409-416, Set. 1971.

HAO, J.; YAMAMOTO, M.; RICHARDSON, T.E.; CHAPMAN, K.M.; DENARD, B.S.; HAMMER, R.E.; ZHAO, G.Q.; HAMRA, F.K. Sohlh2 knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia. **Stem Cells**, v.26, n.6, p.1587-97, Jun.2008.

HARKEY M, ASANO A, ZOULAS ME, TOROK-STORB B, NAGASHIMA J & TRAVIS A 2013. Isolation, genetic manipulation, and transplantation of canine spermatogonial stem cells: progress toward transgenesis through the male germ-line. **Reproduction**, v.146, n.1, p.75-90, Jun.2013.

HARTWICH, G. Side effects of cytostatic and immunosuppressive therapy. **Fortschr. Med**, v. 91, p. 357-362.1973.

HE, Z.; KOKKINAKI, M.; JIANG, J.; DOBRINSKI, I.; DYM, M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. **Biology of Reproduction**, v.82, n.2, p.363-72. Feb. 2010.

HEAD, J.R.; BILLINGHAM, R.E. Immunologically privileged sites in transplantation immunology and oncology. **Perspectives in Biology and Medicine**, v.29, p.115–131, 1985.

HEAD, J.R.; NEAVES, W.B.; BILLINGHAM, R.E. Immune Privilege in The Testis. I. Basic Parameters of Allograft Survival. **Transplantation**. v.36, n.4, p. 423–431. Oct.1983.

HEIDARI, B.; RAHMATI-AHMADABADI, M.; AKHONDI, M.; ZARNANI, A.H.; JEDDI-TEHRANI, M.; SHIRAZI, A.; NADERI, M.M.; BEHZADI, B. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using C-kit and PGP9.5 markers. **The Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.29, n.10, p.1029-38. Oct. 2012.

HERMANN, B.P.; SUKHWANI, M.; SIMORANGKIR, D.R.; CHU, T.; PLANT, T.M.; ORWIG, K.E. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. **Humam Reproduction**, v.24, n.7, p.1704–16, Jul.2009.

HERMANN, B.P.; SUKHWANI, M.; SIMORANGKIR, D.R.; CHU, T.; PLANT, T.M.; ORWIG, K.E.; HERRID, M.; VIGNARAJAN, S.; DAVEY, R.; DOBRINSKI, I.; HILL, J.R. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. **Reproduction**, v. 132, p.617–624, Oct.2006.

HERRID, M.; DAVEY, R.J.; HUTTON, K.; COLDITZ, I.G.; HILL, J.R. A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia. **Reproduction Fertility** v.21, n.3, p.393-9, Dev. 2009.

HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. **Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium**. In: Molecular mechanisms in spermatogenesis (ed. Cheng CY), **Landes Bioscience**, 2007, 1-15p.

HOBBS, R.M.; FAGOONEE, S.; PAPA, A.; WEBSTER, K.; ALTRUDA, F.; NISHINAKAMURA, R.; CHAI, L.; PANDOLFI, P.P. Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. **Cell Stem Cell**, v. 10, n.3, p. 284-98, Mar.2012.

HOBBS, R.M.; SEANDEL, M.; FALCIATORI, I.; RAFII, S.; PANDOLFI, P.P. Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. **Cell**, v.142, n.3, p. 468-79, Aug.2010.

HOFMANN, M.C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; DYM, M. Isolation of male germ-line stem cells; Influence of GDNF. **Developmental Biology**, v.279, n.1, p.114–124, Mar.2005.

HOFMANN, M.C. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.288, n. 1-2, p.95-103, Jun. 2008.

HOLMES, S. D.; SPOTTS, G.; SMITH, R. G. Rat Sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.9, p.4076-80, Mar.1986.

HONARAMOOZ, A.; MEGEE, S.O.; DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation in pigs. **Biology of Reproduction**, v.66, n.1, p.21-8, Jan.2002.

HONARAMOOZ, A.; ZENG, W.; RATHI, R.; KOSTER, J.; RYDER, O.; DOBRINSKI, I. testis tissue xenografts to preserve germ cells from a cloned banteng calf. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, n.2, p.247, Mar. 2005.

HONARAMOOZ, A.; YANG, Y. Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals. **Veterinary Medicine International**, v.4, n.1, p.1-10, Oct.2010.

HOUMARD, B.; SMALL, C.; YNG, L.; NALUAI-CECCHINI, T.; CHENG, E.; HASSOLD, T.; GRISWOLD, M. Global gene expression in the human fetal testis and ovary. **Biology of Reproduction**, v. 81, n.2, p.438–443, Aug.2009.

HUANG W, J.; LIN, Y.W.; HSIAO, K.N; EILBER, K.S.; SALIDO, E.C.; YEN, P.H. Restricted expression of the human DAZ protein in premeiotic germ cells. **Human Reproduction**, v.23, n.6, p.1280-9. Jun. 2008.

HUBNER, K.; FUHRMANN, G.; CHRISTENSON, L.K.; KEHLER, J.; REINBOLD, R.; DE, L.A.; FUENTE, R.; MADEIRA, J.; STRAUSS, J.F.; BOIANI, M.; SCHOLER, H.R; Derivation of Oocytes from Mouse Embryonic Stem Cells. **Science**, v.300, n.5623, p.251-6, May.2003.

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A Radioautographic analysis of their cell cycle properties. **Cells and Tissue Kinetics** , v.4, n.4, p. 313–334, Jul.1971.

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. **The Anatomy Record**, v.169, n.3, p.533-57, Mar.1971.

HULEIHEL, M.; ABUELHIJA, M.; LUNENFELD, E. *In vitro* culture of testicular germ cells: regulatory factors and limitations. **Growth Factors**, v.25, n.4, p.236-52, Aug. 2007.

HUSEN, B.; GIEBEL, J.; RUNE, G. Expression of the integrin subunits alpha 5, alpha 6 and beta 1 in the testes of the common marmoset. **International Journal of Andrology**, v.22, n.6, p.374-84, Dec. 1999.

ITOH, M.; TERAYAMA, H.; NAITO, M.; OGAWA, Y.; TAINOSHO, S. Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. **Journal Reproduction Immunology**, v.67, p.57–67, Set.2005.

IZADYAR, F; SPIERENBERG, G.T.; CREEMERS, L.B.; DEN OUDEN, K.; DE ROOIJ, D.G. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. **Reproduction**. v.124, n.1, p.85-94, Jul.2002.

IZADYAR, F.; DEN OUDEN, K.; CREEMERS, L.B.; POSTHUMA, G.; PARVINEN, M.; DE ROOIJ, D.G. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. **Biology of Reproduction**, v.68, n.1, p.272-81, Jan. 2003.

IZADYAR, F.; WONG, J.; MAKI, C.; PACCHIAROTTI, J.; RAMOS, T.; HOWERTON, K.; YUEN, C.; GREILACH, S.; ZHAO, H.H.; CHOW, M.; CHOW, Y.C.; RAO, J.; BARRITT, J.; BAR-CHAMA, N.; COPPERMAN, A. Identification and characterization of repopulating

spermatogonial stem cells from the adult human testis. **Human Reproduction**, v.26, n.6, p.1296-306, Jun. 2011.

JOSVASEN, N.; BOYUM, A. Haematopoiesis in busulphan-treated mice. A comparison between two different stem cell assays. **Scandinavian journal of haematology's**, v.11, n.1, p.78-86. 1973.

JUNG, H.J.; SONG, H.; YOON, M.J. Stage-dependent DAZL localization in stallion germ cells. **Animal Reproduction Science**, v.147, p.32-8, Jun.2004.

KANATSU-SHINOHARA, M.; MIKI, H.; INOUE, K.; OGONUKI, N.; TOYOKUNI, S.; OGURA, A.; SHINOHARA, T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. **Biology of Reproduction**, v.72, n.4, p. 985–991, Apr.2005.

KANATSU-SHINOHARA, M.; OGONUKI, N.; INOUE, K.; MIKI, H.; OGURA, A.; SHINOHARA, T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. **Biology of Reproduction**, v. 69, n.2, p. 612–616, Aug.2003.

KANATSU-SHINOHARA, M.; TOYOKUNI, S.; SHINOHARA, T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cell. **Biology of Reproduction**, v.70, n.1, p.70–75, Aug.2004.

KANATSU-SHINOHARA, M.; MUNETO, T.; LEE, J.; TAKENAKA, M.; CHUMA, S. Long-term culture of male germ line stem cells from hamster testes. **Biology of Reproduction**, v.78, n.4, p.611-7, Apr.2008.

KANATSU-SHINOHARA, M.; SHINOHARA, T. Germline modification using mouse spermatogonial stem cells. **Methods in Enzymology**, v.477, p.17-36, Abr.2010.

KANCHEVA, L.S.; MARTINOVA, Y.S.; GEORGIEV, V.D. Prepubertal Sertoli cells secrete a mitogenic factor(s) that stimulates germ and somatic cell proliferation. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 69, n.2-3, p.121-128, Mar.1990.

KAUR, G.; MITAL, P.; DUFOUR, J.M. Testis immune privilege - Assumptions versus facts. **Animal Reproduction**, v.10, n.1, p.3-15, Jan.2013,

KASIMANICKAM, V.; KASIMANICKAM, R. Exogenous retinoic acid and cytochrome P450 26B1 inhibitor modulate meiosis-associated genes expression in canine testis, an in vitro model. **Reproduction Domestic Animal**, v.49, n.2, p.315-23, Apr.2014.

KERR, J.B.; LOVELAND, K.L.; O 'BRYAN, M.K.; KRETZER, D.M. **Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms**. In: NEIL JD. (ed.) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition.2006, 827-947p.

KHAIRA, H.; MCLEAN, D.; OHL, D.A.; SMITH, G.D. Spermatogonial spermatogonial stem cell isolation, storage, and transplantation. **Journal Andrology**, v.26, n.4, p.442-50, Jul-Aug.2005.

KIERSZENBAUM, A.L. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. **Endocrine Reviews**, v.15, n.1, p.116-34, Feb. 1994.

KIGER, A.A.; WHITE-COOPER, H.; FULLER, M.T. Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. **Nature**, v.407, n.6805, p.750-4, Oct.2000.

KIM, Y.; SELVARA, J.V.; DOBRINSKI, I.; MCENTEEMC, L.; TRAVIS, A.J. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. **Journal Andrology**, v.27, n.2, p.248-56, Mar-Apr. 2006.

KIM, Y.; SELVARAJ, V.; PUKAZHENTHI, B.; TRAVIS, A.J. Effect of donor age on success of spermatogenesis in feline testis xenografts. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, n.7, p. 869–876, Dec.2007.

KIM, Y.; TURNER, D.; NELSON, J.; DOBRINSKI, I.; MCENTEE, M.; TRAVIS, A.J. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. **Reproduction**, v.136, n.6, p.823-31, Dec. 2008.

KIM, Y.H.; KIM, B.J.; KIM, B.G.; LEE, Y.A.; KIM, K.J.; CHUNG, H.J.; HWANG, S.; WOO, J.S.; PARK, J.K.; SCHMIDT, J.A.; PANG, M.G.; RYU, B.Y. Stage-specific embryonic antigen-1 expression by undifferentiated spermatogonia in the prepubertal boar testis. **Journal Animal Science**, v. 91, n.7, p.3143-54, Jul. 2013.

KORUJI, M.; MOVAHEDIN, M.; MOWLA, S.J.; GOURABI, H.; ARFAEE, A.J. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v.45, n.5-6, p.281-9, May-Jun. 2009.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.11, p.6487–6492, 2003.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M.; BRINSTER, R. Growth factors essential for selfrenewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.47, p.16489–16494, Set. 2004.

KOUBOVA, J.; MENKE, D.B.; ZHOU, Q.; CAPEL, B.; GRISWOLD, M.D.; PAGE, D.C. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.103, n.8, p.2474-9, Feb.2006.

KUBOTA, H.; WU, X.; GOODYEAR, S.M.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. **FASEB Journal**, v.25, n.8, p.2604-14. Agu.2011.

KUIJK, E.W.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.A. The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. **Reproduction**, v.138, n.4, p. 721–731, Oct.2009.

LACHAM-KAPLAN, O. In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. **Reproduction**. v.128, n.2, p.147-52, Aug 2004.

KUIJK, E.W.; DE GIER, J.; DE S LOPES, S.M.C.; CHAMBERS, I.; VAN PELT, A.M.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, A.J. A distinct expression pattern in mammalian testes indicates a conserved role for NANOG in spermatogenesis. **Plos One**, v.5, 6, p. e10987, jun.2010.

LACHAM-KAPLAN, O. In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. **Reproduction**, v.128, n.2, p.147-52, Aug.2004.

LAMB, D. J.; SPOTTS, G. S.; SHUBHADA, S.; AND BAKER, K. R. Partial characterization of a unique mitogenic activity secreted by rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 79, n.1-3, p.1–12, Aug.1991.

LAWSON, K.A.; DUNN, N.R.; ROELEN, B.A.J.; ZEINSTR, L.M.; DAVIS, A.M.; WRIGHT, C.V.E.; KORVING, J.P.W.F.M.; HOGAN, B.L.M.; Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes e Development**, v.13, n.4, p. 424–436, Feb.1999.

LE BOUFFANT, R.; GUERQUIN, M.J.; DUQUENNE, C.; FRYDMAN, N.; COFFIGNY, H.; ROUILLER-FABRE, V.; FRYDMAN, R.; HABERT, R.; LIVERA, G. Meiosis initiation in the human ovary requires intrinsic retinoic acid synthesis. **Human Reproduction**, v.25, n.10, p. 2579–2590, Oct.2010.

LEE, K.H.; LEE, R.; LEE, W.Y.; KIM, D.H.; CHUNG, H.J.; KIM, J.H.; KIM, N.H.; CHOI, S.H.; KIM, J.H.; SONG, H. Identification and in vitro derivation of spermatogonia in beagle testis. **PLoS One**, v.9, n.10, p.e109963, Oct 2014.

LEE, K.H.; LEE, W.Y.; KIM, J.H.; YOON, M.J.; KIM, N.H.; KIM, J.H.; UHM, S.J.; KIM, D.H.; CHUNG, H.J.; SONG, H. Characterization of GFR α -1-positive and GFR α -1-negative spermatogonia in neonatal pig testis. **Reproduction Domestic Animals**, v. 48, n.6, p. 954-60, Dec.2013.

LIN, S.C.; DOLLÉ, P.; RYCKEBÜSCH, L.; NOSEDA, M.; ZAFFRAN, S.; SCHNEIDER, M.D.; NIEDERREITHER, K. Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v107, n.20, p.9234-9. May. 2010.

LINGAAS, F.; COMSTOCK, K.E.; KIRKNESS, E.F.; SORENSEN, A.; AARSKAUG, T.; HITTE, C.; NICKERSON, M.L.; MOE, L.; SCHMIDT, L.S.; THOMAS, R. A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. **Human Molecular Genetics**, v.12, n.23, p.3043-53, Dec. 2003.

LUI WY, LEE WM, CHENG CY. Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. **Endocrinology**. v.142, p.1865–1877, 2001.

LIU, S.; TANG, Z.; XIONG, T.; TANG, W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. **Reproduction Biology Endocrinology**. v. 24, p.9:141. Oct 2011.

LOIR, M. Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. **Molecular Reproduction Development**, v. 53, n.4, p.434–442, Aug.1999.

MA, W.; AN, L.; WU, Z.; WANG, X.; GUO, M.; MIAO, K.; MA, W.; TIAN, J. Efficient and safe recipient preparation for transplantation of mouse spermatogonial stem cells: pretreating testes with heat shock. **Biology of Reproduction**, v.85, n.4, p.670-7. Oct.2011.

MAHLA, R.S.; REDDY, N.; GOEL, S. Spermatogonial stem cells (SSCs) in buffalo (*Bubalus bubalis*) testis. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p.e36020, Apr.2012.

MÄKELÄ, J.A.; TOPPARI, J.; RIVERO-MÜLLER, A.; VENTELÄ, S.; Reconstruction of mouse testicular cellular microenvironments in long-term seminiferous tubule culture. **PLoS One**, v. 9, n.3, p. e90088, Mar.2014.

MAKI, C.B.; PACCHIAROTTI, J.; RAMOS, T.; PASCUAL, M.; PHAM, J.; KINJO, J.; ANORVE, S.; IZADYAR, F. Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testis. **Human Reproduction**, v. 24, n.6, p. 1480-1491, Jun.2009.

MALKOV, M.; FISHER, Y.; DON, J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.59, n.1, p.84-92, Jul.1998.

MARK, M.; GHYSELINCK, N.B.; CHAMBON, P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p.451–480, Nov.2006.

MARK, M.; JACOBS, H.; OULAD-ABDELGHANI, M.; DENNEFELD, C.; FERET, B.; VERNET, N.; CODREANU, C.A.; CHAMBON, P.; GHYSELINCK, N.B. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. **Journal of Cell Science**, v.121, n.19, p. 3233–3242, Oct.2008.

MARTIN, L.A.; SEANDEL, M. Propagation of Adult SSCs: From Mouse to Human. **BioMed Research International**, v. 5, n.1, p.384-734. Jan.2013.

MARTINS, D.S. **Característica de células tronco germinativa caninas para o tratamento da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)**. 2006.105f. Tese (Doutorado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2006.

MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E.; SARAIVA, N.Z.; WENCESLAU, C.V.; MORINI, A.C.; KERKIS, I.; GARCIA, J.M.; MIGLINO, M.A. Early development and putative primordial germ cells characterization in dogs. **Reproduction Domestic Animal**, v.46, n.1, p.62-6. Feb. 2011.

MATSUI, Y.; ZSEBO, K.; HOGAN, B. L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. **Cell**, v. 70, n.5, p.841-847. Sep.1992.

MCLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.163, n.1-2, p.3-9. May 2000.

MEEHAN, T.; SCHLATT, S.; O'BRYAN, M. K.; DE KRETZER, D. M.; LOVELAND, K. L. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activating, follistatin and FSH. **Development Biology**, v.220, n.2, p.225-37, Apr.2000.

MEISTRICH, M.L. Male gonadal toxicity. **Pediatr Blood Cancer**, v.53, n.2, p.261-6, Agust. 2009.

MENG, X.; LINDAHL, M.; HYVÖNEN, M.E.; PARVINEN, M.; DE ROOIJ, D.G.; HESS, M.W.; RAATIKAINEN-AHOKAS, A.; SAINIO, K.; RAUVALA, H.; LAKSO, M.; PICHEL, J.G.; WESTPHAL, H.; SAARMA, M.; SARIOLA, H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. **Science**, v. 287, n.5457, p.1489–1493, Feb.2000.

MENG, X.; PATA, I.; PEDRONO, E.; POPSTUEVA, A.; DE ROOIJ, D.G.; JANNE, M.; RAUVALA, H.; SARIOLA, H. Transient disruption of spermatogenesis by deregulated expression of neurturin in testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.184, n.1-2, p.:33-9, nov.2001.

MIALOT, J.P. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. (ed) Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988. 160 p.

MICALLEF, S.J.; JANES, M.E.; KNEZEVIC, K.; DAVIS, R.P.; ELEFANTY, A.G.; STANLEY, E.G. Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells. **Diabetes**, v.54, n.2, p.301-5. Feb. 2005.

MOLYNEAUX, K.A.; STALLOCK, J.; SCHAIBLE, K.; WYLIE, C. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. **Development. Biology**, v.240, n.2, p.488-98, Dec.2001.
MOTA, P.C.; RAMALHO-SANTOS, J.; SCHLATT, S. Xenografting as a Tool to Preserve Endangered Species: Outcomes and Challenges in Model Systems. **Veterinary Medicine International**, v 1, n.7, p.1-9, Aug.2011.

MURTA, D.; BATISTA, M.; SILVA, E.; TRINDADE, A.; HENRIQUE, D.; DUARTE, A.; LOPES-DA-COSTA, L. Dynamics of Notch Pathway Expression during Mouse Testis Post-Natal Development and along the Spermatogenic Cycle. **PLoS One**, v. 8, n.8,p. 1–12, Aug.2013.

NAGANO, M.; BRINSTER, R.L. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. **Acta Pathol Microsc Immunol Scand**, v. 106, n.1, p.47–57, Jan.1998.

NAGANO, M.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. **Biology of Reproduction**, v.60, n.6, p.1429-36, Jun. 1999.

NAGANO, M.; RYU, B. Y.; BRINSTER, C.J.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v.68, n.6, p.2207-14, Jun.2003.

- NAKAI, M.; KANEKO, H.; SOMFAI, T. Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. **Reproduction**, v.139, n.2, p.331-5, Feb. 2010.
- NAYERNIA, K.; LI, M.; JAROSZYNSKI, L.; KHUSAINOV, R.; WULF, G.; SCHWANDT, I.; KORABIOWSKA, M.; MICHELMANN, H.W.; MEINHARDT, A.; ENGEL, W. Stem cell-based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. **Human Molecular Genetics**, v.13, n.14, p.1451-60, Jul.2004.
- NAYERNIA, K.G.; MAIER, L.S.; WAGNER, S.; DRESSEL, R.; LEE, J.H.; NOLTE, J.; WOLF, F.; LI, M.; ENGEL, W.; HASENFUSS, G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. **Nature**, v.440, n.7088, p.1199-203, Apr. 2006.
- NEVES, E.S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogenico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*)**. 2001. 135f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) -Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001.
- NIKLOWITZ, R.; KHAN, S.; BERGMANN, M.; HOFFMANN, K.; NIESCHLAG, E. Differential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on Leydig cell function and restoration of spermatogenesis in hypophysectomized and photoinhibited Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). **Biology of Reproduction**, v. 41, n.5, p.871-880, Nov.1989.
- NIU, Z.; HU, Y.; LIAO, M.; YU, M.; ZHU, H.; WANG, L.; WU, J.; BAI, C.; LI, G.; HUA, J. Conservation and function of Dazl in promoting the meiosis of goat male germline stem cells. **Molecular Biology and Reproduction**, v.41, n.5, p. 2697-707, May.2014.
- O'SHAUGHNESSY, P.J.; MONTEIRO, A.; VERHOEVEN, G.; DE GENDT, K.; ABEL, M.H. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotropin- deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. **Reproduction**, v.139, n.1, p.177-84, Jan. 2010.
- OAKBERG, E.F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. **Anatomy Record**, v.169, n.3, p.515-31, Mar. 1971.
- OATLEY, J.M.; REEVES, J.J.; MCLEAN, D.J. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. **Biology of Reproduction**, v.71, n.3, p.942-7, Sep. 2004.
- OATLEY, J.M.; REEVES, J.J.; MCLEAN, D.J. Establishment of spermatogenesis in neonatal bovine testicular tissue following ectopic xenografting varies with donor age. **Biology Reproduction**, v.72, n.2, p.358-64, Feb. 2005.
- OATLEY, J.M.; BRINSTER, R. L. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.24, p.263-86. Jun.2008.
- OATLEY, J.M.; OATLEY, M.J.; AVARBOCK, M.R.; TOBIAS, J.W.; BRINSTER, R.L. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. **Development**, v.136, n.7, p.1191-9, Apr. 2009.

OATLEY, J.M.; BRINSTER, R.L. The germline stem cell niche unit in mammalian testis. **Physiological Reviews**, v. 92, n.2, p. 577-95, Apr.2012.

OGAWA, T.; ARÉCHAGA, J.M.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. **The International Journal Development Biology**, v.41, n.1 p.111-22. Feb.1997.

OGAWA, T.; DOBRINSKI, I.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. **Biology of Reproduction**, v.60, n.2, p.515-21, Feb.1999.

OGAWA, T.; DOBRINSKI, I.; BRINSTER, R.L. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. **Tissue Cell**, v. 31, p.461–472, Oct.1999.

OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. **Nature Medicine**, v.6, n.1, p.29-34. Jan 2000.

OHBO, K.; YOSHIDA, S.; OHMURA, M.; OHNEDA, O.; OGAWA, T.; TSUCHIVA, H.; KUWANA, T.; KEHLER, J.; ABE, K.; SCHÖLER, H.R.; SUDA, T. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. **Development Biolology**, v. 258, n.1, p. 209–225, 2003.

OHTA, H.; YOMOGIDA, K.; DOHMAE, K.; NISHIMUNE, Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of C-kit and its ligand SCF. **Development**, v.127, n.10, p. 2125-31, May.2000.

OHTA, T.; MIYAKE, H.; MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K.; MIURA, Follicle stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Biology of Reproduction**, v. 77, n.6, p.970–977, Dec.2007.

OKADA, Y.; SHIMAZAKI, T.; SOBUE, G.; OKANO, H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Development Biology**, v. 275, n.1, p.124-42. Nov. 2004.

OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.103, n.8, p.2725-9, Feb.2006.

ORTH, J.; CHRISTENSEN, A.K. Autoradiographic localization of specifically bound ¹²⁵I-labeled follicle stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis. **Endocrinology**, v. 103, n.5, p.1944-1951, Nov.1978.

PARK, M.H.; PARK, J.E.; KIM, M.S.; LEE, K.Y.; PARK, H.J.; YUN, J.I.; CHOI, J.H.; LEE, E.S.; LEE, S.T. Development of a high-yield technique to isolated spermatogonia stem cells from porcine testis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.31, n.8, p. 983-91, Aug.2014.

PARVINEN, M.; MARANA, R.; ROBERTSON, D.M.; HANSSON, V.; RITZEN, E.M. **Functional cycle of rat Sertoli cells: Differential binding and action of follicle-stimulating hormone at various stages of spermatogenic cycle.** In: Steinberger A, Steinberger E. (eds) Testicular development structure and function. Raven Press, New York, 1980, 425-532p.

PAULA, A.R., CARDOSO, F.M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. II. População celular dos túbulos seminíferos e rendimento espermatogênico. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**, v. 47, n.4, p. 535-547, Ago1995.

PELLEGRINI, M.; FILIPPONI, D.; GORI, M.; BARRIOS, F.; LOLICATO, F.; GRIMALDI.P.; ROSSI, P.; JANNINI, E.A.; GEREMIA, R.; DOLCI, S. ATRA and KL promote differentiation toward the meiotic program of male germ cells. **Cell Cycle**, v.7, n.24, p.3878-88. Dec. 2008.

PÉREZ-CRESPO M.; PERICUESTA, E.; PÉREZ-CEREZALES, S.; ARENAS, M.I.; LOBO M.V.; DÍAZ-GIL, J.J.; GUTIERREZ-ADAN, A. Effect of liver growth factor on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in Busulfan-treated mice. **Reproduction Biolgy Endocrinology**. v.4, p.9:21, Feb.2011.

PESCE, M.; ANASTASSIADIS, K.;SCHÖLER, H.R. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n.3-4, p. 144–152, 1999.

PESCE, M.; WANG, X.; WOLGEMUTH, D.J.; SCHÖLER, H.R. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. **Mechanisms of Development - Journal**, v. 71, n.1-2, p.89–98, 1998.

PIERI, N. C. G. ; SOUZA, AF ; CASALS, JB ; ROBALLO, KCS ; AMBRÓSIO, CE ; MARTINS, DS . Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. **Reproduction in Domestic Animals** v. 50, p. n/a-n/a, Mar.2015.

POLLANEN, P.; NIEMI, M. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid QU N.; NAITO, M.; LI, J.; TERAYAMA, H.; HIRAI, S.; ITOH, M. Xenogeneic and endogenous spermatogenesis following transplantation of rat germ cells into testes of immunocompetent mice. **Reproduction and Fertility**, v.24, n.2, p.337-43, Dec. 2012.

RAMASWAMY, S.; PLANT, T.M.; MARSHALL, G. R. Pulsatile stimulation with recombinant single chain human luteinizinghormone elicits precocious sertoli cell proliferation in the juvenile malerhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Biology of Reproduction**,v. 63, n.1, p.82-8. Jul. 2000.

RATHI, R.; ZENG, W.; MEGEE, S.; CONLEY, A.; MEYERS, S.; DOBRINSKI, I. Maturation of testicular tissue from infant monkeys after xenografting into mice. **Endocrinology**, v.149, n.10, p.5288-96, Oct.2008.

REDING, S.C.; STEP NOSKI, A.L.; CLONINGER, E.W.; OATLEY, J.M. THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the prepubertal bull testis. **Reproduction**, v. 139, n.5,p. 893-903, May.2010.

REECE, W.O. **Fisiologia dos animais Domésticos**. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogansa, 2006. 926p.

REIJO, R.A.; DORFMAN, D.M.; SLEE, R.; RENSHAW, A.A.; LOUGHLIN, K.R.; COOKEH PAGE, D.C. DAZ family proteins exist throughout male germcell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. **Biology of Reproduction**, v. 63, n.5, p.1490–1496, Nov.2000.

REIMANN, N.; BARTNITZKE, S.; BULLERDIEK, J.; SCHMITZ, U.; ROGALLA, P.; NOLTE, I.; RONNE, M. An extended nomenclature of the canine karyotype. **Cell Genetic**, v. 73, n.1-2, p.140–144, 1996.

REYNOLDS, N.; COLLIER, B.; MARATOU, K.; BINGHAM, V.; SPEED, R.M.; TAGGART, M.; SEMPLE, C.A.; GRAY, N.K.; COOKE, H.J. Dazl binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells. **Molecular Genetics**, v.14, n.24, p.3899-909. Nov.2005.

REYNOLDS, N.; COLLIER, B.; BINGHAM, V.; GRAY, N.K.; COOKE, H.J. Translation of the synaptonemal complex component Sycp3 is enhanced in vivo by the germ cell specific regulator Dazl. **RNA**, v.13, n.7, p.974-81. Jun. 2007.

RILIANAWA, T.I.; SPEED, R.; TAGGART, M.; COOKE, H.J. Spermatogenesis in testes of Dazl null mice after transplantation of wild-type germ cells. **Reproduction**, n.126, p.599-604, 2003.

ROSSI, P.; DOLCI, S. Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of Mammalian spermatogenesis. **Frontiers Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, n.1, p.181, Nov.2013.

ROSSI, P.; SETTE, C.; DOLCI, S.; GEREMIA, R. Role of C-kit in mammalian spermatogenesis. **Journal Endocrinological Investigation**, v.23, n.3, p.609-15, Oct. 2000.

RUGGIU M, SPEED R.; TAGGART M.; MCKAY S.J.; KILANOWSKI F.; SAUNDERS P.; DORIN J.; COOKE H.J. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. **Nature**, v.389, n.6646, p.73-7. Sep. 1997.

RUSSELL, L.D.; REN, H.P.; SINHO-HIKIN, I. A comparative study in twelve Mammalia species of volume densities volume and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **The American journal of anatomy**, v.188, n.1, p.21-30, May.1990.

RYU, B.Y.; ORWIG, K.E.; OATLEY, J.M.; LIN, C.C.; CHANG, L.J.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Efficient Generation of Transgenic Rats Through the Male Germline Using Lentiviral Transduction and Transplantation of Spermatogonial Stem Cells. **Journal of Andrology**, v. 28, n.2, p. 353-60, Mar.2007.

SAITOU, M.; BARTON, S.C.; SURANI, M.A. A molecular programmer for the specification of germ cell fate in mice. **Nature**, v.418, n.6895, p.293-300, Jul.2002.

SALERO, E.; HATTEN, M.E. Differentiation of ES cells into cerebellar neurons.

Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, v.104, n.8, p.2997-3002, Feb. 2007.

SANBERG, P.R.; BORLONGAN, C.V.; SAPORTA, S.; CAMERON, D.F. Testis-derived Sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain.

Nature Biotechnology, v.14, p. 1692–1695, Oct.1996.

SANDLOW, J.I.; FENG, H.L.; ZHENG, L.J.; SANDRA, A Migration and ultrastructural localization of the C-kit receptor protein in spermatogenic cells and spermatozoa of the mouse. **Journal of Urology**, v.161, n.5, p.1676–1680, May.1999.

SANTANA, J.P.S. **Inseminação artificial canina utilizando sêmem fresco**. 2012. 33f.Tese (Doutorado em clínica médica e cirúrgica de pequenos animais). Centro Universitário de Grandes Dourados, Dourados, 2012.

SARIOLO, H.; IMMONEN, T. GDNF maintains mouse spermatogonial stem cells in vivo and in vitro. **Methods in Molecular Biology**, v.450, n.1, p.127-35, 2008.

SATO, M.; KIMURA, T.; KUROKAWA, K.; FUJITA, Y.; ABE, K.; MASUHARA, M.; TASUNAGA, T.; RYO, A.; YAMAMOTO, M.; NAKANO, T. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. **Mechanisms of Development**, v. 113, n.1, p. 91–94, Apr.2002.

SATO, T.; AIYAMA, Y.; ISHII-INAGAKI, M.; HARA, K.; TSUNEKAWA, N.; HARIKAE, K.; UEMURA-KAMATA, M.; SHINOMURA, M.; ZHU, X.B.; MAEDA, S.; KUWAHARA-OTANI, S.; KUDO, A. Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of Sertoli cells in mouse and hamster testes. **Plos One**, v. 6, n.12, p. e28367, Dec.2011.

SCHLATT, S.; ROSIEPEN, G.; WEINBAUER, G.F.; ROLF, C.; BROOK, P.F.; NIESCHLAG, E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. **Human Reproduction**, v.14, n.1, p.144-50. Jan. 1999.

SCHLATT, S.; KIM, S.S.; GOSDEN, R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. **Reproduction**, v.124, n.3, p.339-46, Sep. 2002.

SCHÖNFELDT, V.V.; WISTUBA, J.; SCHLATT, S. Notch-1, C-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. **Cytogenet Genome Research**, v.105, n.2-4, p.235-9, 2004.

SCHRANS-STASSEN, B.H.; SAUNDERS, P.T.; COOKE, H.J.; DE ROOIJ, D.G. Nature of the spermatogenic arrest in *Dazl* ^{-/-} mice. **Biology of Reproduction**, v.65, n.3, p. 771-6, Sep.2001.

SCHRANS-STASSEN, B.H.; VAN DE KANT, H.J.; DE ROOIJ, D.G.; VAN PEL, T. A.M. Differential expression of C-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. **Endocrinology**, v.140, n.12, p.5894-900. Dec.1999.

SHAMBLOTT, M. J., AXELMAN, J., WANG, S., BUGG, E. M., LITTLEFIELD, J. W., DONOVAN, P. J., BLUMENTHAL, P. D., HUGGINS, G. R. AND GEARHART, J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, n23, p.13726-13731, Nov.1998.

SHARPE, R. Regulation of spermatogenesis. In: **The Physiology of Reproduction**, edited by Knobil E, Neill JD. New York: Raven, p.1363–1434, 1994.

SHETTY, J.; MARATHE, G.K.; DIGHE, R.R. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. **Endocrinology**, v.137, n.5, p.2179–2182, May.1996.

SHINOHARA, T.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.96, n.10, p.5504-9, May. 1999.

SHINOHARA, T., AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models. **Development Biology**, v. 220, n.2, p.401-11, Apr. 2000.

SHINOHARA, T.; ORWIG, K.E.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.97, n.15, p.8346-51. Jul. 2000b.

SHINOHARA, T.; INOUE, K.; OGONUKI, N. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination Human **Reproduction**, v. 17, n.12, p.3039–3045, 2002.

SILVA, C.; WOOD, J.R.; SALVADOR, L.; ZHANG, Z.; KOSTETSKII, I.; WILLIAMS, C.J.; STRAUSS, J.F. Expression profile of male germ cell-associated genes in mouse embryonic stem cell cultures treated with all-trans retinoic acid and testosterone. **Molecular Reproduction and Development**, v.76, p.111-21. Jan. 2009.

SILVA, R.C.; COSTA, G.M.; LACERDA, S.M.; BATLOUNI, S.R.; SOARES, J.M.; AVELAR, G.F. Germ cell transplantation in felids: a potential approach to preserving endangered species. **Journal Andrology**, v. 33, n.2, p. 264–276, Mar-Apr.2012.

SIMON, L.; EKMAN, G.; TYAGI, G.; HESS, R.; MURPHY, K.M.; COOKE, P. Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF. Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. **Experimental Cell Research**, v.313, n.14, p.3090–3099, Aug.2007.

SIMON, L.; EKMAN, G.C.; TYAGI, G.; HESS, R.A.; MURPHY, K.M.; COOKE, P.S. Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. **Experimental Cell Research**, v.313, n.14, p.3090–3099, Aug.2007.

SIMONI, M.; NIESCHLAG, E. FSH in therapy: physiological basis, new preparations and clinical use. **Reproductive Medicine Review**, v. 4, n.3, p.163–177, Oct.1995.

SINGH, J.; HANDELSMAN, D.J. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. **Journal of Endocrinology**, v.151, n.1, p.37-48. Oct.1996.

SINGH, J.; HANDELSMAN, D.J. The effects of recombinant FSH on testosterone- induced spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. **Journal Andrology**, v.17, n.4, p.382-93, Jul-Aug. 1996.

SINHA HIKIM, A.P.; SINHA HIKIM, S.; AMADOR, A.G.; BARTKE, A.; WOOLF, A.; RUSSELL, L.D. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. **The American Journal of Antomy**, v.192, n.2, p.194-213, Oct.1991.

SIU, M.K.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- α , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. **Endocrinology**, v. 144, n.1, p.371–387, Jan. 2003.

SOARES, J.M.; AVELAR, G.F.; FRANÇA, L.R. The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). **Journal Anatomy**, v.215, n.4, p.462-71. Oct.2009.

SOFIKITIS, N.; KAPONIS, A.; MIO, Y.; MAKREDIMAS, D.; GIANNAKIS, D.; YAMAMOTO, Y.; KANAKAS, N.; KAWAMURA, H.; GEORGIOU, J.; SCHRADER, M.; LOLIS, E.; GIANNAKOPOULOS, X.; LOUTRADIS, D.; TARLATZIS, V.; MIYAGAWA, I. Germ cell transplantation: a review and progress report on ICSI from spermatozoa generated in xenogeneic testes. **Human Reproduction Update**, v.9, n.3, p.291–307, May-jun.2003.

SOUZA, A.F. **Estudo Biológico das Células Germinativas Caninas**. 2013.87f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOPRANO, D., R.; TEETS, B.W.; SOPRANO, K.J. Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. **Vitama Hormonal**, v. 75, n.1, p.:69–95, Nov.2007.

SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells find their niche. **Nature**, v.414, n.6859, p.98-104. Nov. 2001.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. In vitro growth and development of mammalian testes. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. **The Testis**. New York: Academic Press, 1970, p.363–391.

SUAREZ-PINZON W, KORBUTT GS, POWER R, HOOTON J, RAJOTTE RV, RABINOVITCH A. Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism. **Diabetes**, v. 49, n.11, p.1810– 1818. Nov.2000.

SUEMORI, H.; TADA, T.; TORII, R. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. **Development Dynamics**, v.222, n.2, p.273-9, Oct.2001.

TADOKORO, Y.; YOMOGIDA, K.; OHTA, H.; TOHDA, A.; NISHIMUNE, Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. **Mechanisms of Development**, v. 113, n. 1, p.29–39, Apr.2002.

TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. **Immunology - Annual Review of Immunology**, v.15, p.797-819. Nov.1997.

TAJIMA, Y.; ONOUE, H.; KITAMURA, Y.; NISHIMUNE, Y. Biologically active kit ligand growth factor is produced by mouse Sertoli cells and is defective in Sld-mutant mice. **Development**, v.113, n.3, p.1031-1035, Nov.1991.

TAM, P. P.; SNOW, M. H. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v. 64, n.1, p. 133-147. Oct.1981.

TANAKA, M.; ASANO, K.; QIU, C.H. Immune regulation by apoptotic cell clearance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1209, p.37–42, Oct.2010.

TEGELENBOSCH, R. A.; DE ROOIJ, D. G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. **Mutation Research**, v. 290, n.2, p.193-200, Dec. 1993.

TEGELENGOSCH, R.A.; DE ROOIJ, D.G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. **Mutation Research**, v. 290, n.2, p. 193–200, 1993.

THOMSON, J.A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T.G. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.92, n.17, p.7844-8, Aug. 1995.

THOMSON, J.A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T.G. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.55, n.2, p.254-9, Aug .1996.

TIPTANAVATTANA, N.; THONGKITTIDILOK, C.; TECHAKUMPHU, M.; THARASANIT, T.; Characterization and in vitro culture of putative spermatogonial stem cells derived from feline testicular tissue. **Journal Reproduction Development**, v.59, n.2, p.189-95, Dev.2013.

TOKUDA, M.; KADOKAWA, Y.; KURAHASHI, H.; MARUNOUCHI, T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. **Biology of Reproduction**, v.76, n.1, p.130–141, Sep.2007.

TOMAC, A.C.; GRINBERG, A.; HUANG, S.P.; NOSRAT, C.; WANG, Y.; BORLONGAN, C.; WANG, Y.; BORLONGAN, C.; LIN, S.Z.; CHIANG, Y.H.; OLSON, L.; WESTPHAL, H. Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1 availability regulates glial cell

line-derived neurotrophic factor signaling: evidence from mice carrying one or two mutated alleles. **Neuroscience**, v. 95, n.4, p1011–1023, 2000.

TOYOOKA, Y.; TSUNEKAWA, N.; TAKAHASHI, Y.; MATSUI, Y.; SATOH, M.; NOCE T. Expression and intracellular localization of mouse vasa-homologue protein during germ cell development. **Mechanisms of Development**. v.93, n.1-2, p. 139–149, May.2000.

TOYOOKA, Y.; TSUNEKAWA, N.; AKASU, R.; NOCE, T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.100, n.20, p.11457-62, Sep.2003.

TRAUTMANN, E.; GUERQUIN, M.J.; DUQUENNE, C.; LAHAYE, J.B.; HABERT, R.; LIVERA, G. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. **Cell Cycle**, v.7, n.5, p.656-64, Mar.2008.

TRAVIS, A.J.; KIM, Y.; MEYERS-WALLEN, V. Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. **Reproduction Domestic Animals**, v.44, n.2, p.22-8. **Supplement 2**, Jul. 2009.

TREANOR, J.J.; GOODMAN, L.; DE SAUVAGE, F.; STONE, D.M.; POULSEN, K.T.; BECK, C.D.; GRAY, C.; ARMANINI, M.P.; POLLOCK, R.A.; HEFTI, F.; PHILLIPS, H.S.; GODDARD, A.; MOORE, M.W.; BUJ-BELLO, A.; DAVIES, A.M.; ASAI, N.; TAKAHASHI, M.; VANDLEN, R.; HENDERSON, C.E.; ROSENTHAL, A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. **Nature**, v.382, n.6586, p.0-3, Jul.1996.

TSAI, K.; CLARK, L.; MURPHY, K. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. **Mamm Genome**, v. 18, n.6-7, p.444-51, Jul.2007.
TUNG KS, TEUSCHER C, MENG AL. Autoimmunity to spermatozoa and the testis. **Immunology Reviews**, v.55, n.1, p. 217–255, Aug.1981.

ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY, J.R. A.R.; BEITINS, I.Z.; PADMANABHAN, V. Follicle-stimulating is hormones: characterization and physiological relevance. **Endocrine Reviews**, v.16, n.6, p.765-87, Dec.1995.

VAN PELT, A.M.; MORENA, A.R.; VAN DISSEL-EMILIANI, F.M.; BOITANI, C.; GAEMERS, I.C.; DE ROOIJ, D.G.; STEFANINI, M. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. **Biology of Reproduction**, v.55, n.2, p.439-44, Aug. 1996.

VANSANDT, L.M.; PUKAZHENTHI, B.S.; KEEFER, C.L. Molecular markers of spermatogonial stem cells in the domestic cat. **Reproduction Domestic Animals**, v. 47, p. 256-60, 2012, Supplement.6.

VIGLIETTO, G.; DOLCI, S.; BRUNI, P.; BALDASSARRE, G.; CHIARIOTTI, L.; MELILLO, R.M.; SALVATORE, G.; CHIAPPETTA, G.; SFERRATORE, F.; FUSCO, A.; SANTORO, M. Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin can act as paracrine growth factors stimulating DNA synthesis of Ret-expressing spermatogonia. **International Journal Oncology**, v.16, n.4, p.689-94, Apr. 2000.

VON BUBNOFF, N.; DUYSSTER, J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. **Deutsches Ärzteblatt International**, v.107, n.7, p.114-21, Feb.2010.

WAITES, G.M.H., JONES, A.R.; MAIN, S. J; COOPER, T.G. The entry of antifertility and other compounds into the testis. **Advice in the Biosciences**, v.10, p.101-116, Nov.1973.

WANG, X.; DING, Q.; ZHANG, Y.; WANG, H.; MA, L.; XI, E. X. Two allogeneic descendents derived from the high-dose Busulfan-treated infertile mouse model after freeze-thawed spermatogonial stem cell transplantation. **Fertility and Sterility**, v.90, n.4, p.1538-49. Jan. 2008.

WONG CH, MRUK DD, LUI WY, CHENG CY. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. **Journal Cell Science**, v, 117, n.pt15, p.783–798, Feb.2004.

WU, J.; SONG, W.; ZHU, H.; NIU, Z.; MU, H.; LEI, A.; YANG, C.; PENG, S.; LI, X.; LI, G.; HUA, J. Enrichment and characterization of Thy1-positive male germline stem cells (mGSCs) from dairy goat (*Capra hircus*) testis using magnetic microbeads. **Theriogenology**, v.80, n.9, p.1052-60. Sep. 2013.

WYLIE, C.C.; STOTT, D.; DONOVAN, P.J. Primordial germ cell migration. *Development Biology*, v.2, n.1, p. 433–488, 1986.

XIE, B.; QIN, Z.; HUANG, B.; XIE, T.; YAO, H.; WEI, Y.; YANG, X.; SHI, D.; JIANG, H. In vitro culture and differentiation of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogonia. **Reproduction Domestic Animals**, v.45, n.2, p.275-82. Apr.2010.

YAN, W.; SUOMINEN, J.; TOPPARI, J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. **Journal of Cell Science**, v.113, n. 1, p.161-8, Jan. 2000.

YEN PH. Putative Biological functions of the DAZ family. **International Journal of Andrology**, v.27, n.3, p. 125–129, Jun.2004.

YING, Y.; LIU, X.M.; MARBLE, A.; LAWSON, K.A.; ZHAO, G.Q. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.14, n.7, p.1053-63, Jul.2000.

YING, Y.; ZHAO, G.Q. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. **Development Biology**, v.232, n.2, p.484–492, Apr. 2001.

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. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p.1303–7, Oct.2003.

YOSHINAGA, K.; NISHIKA, W.A.S., OGAWA, M.; HAYASHI, S.; KUNISADA, T.; FUJIMOTO, T.; NISHIKAWA, S. Role of C-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of C-kit expression and function. **Development**, v.113, n.2, p.689-99, Oct.1991.

YUAN, Z.; HOU, R.; WU, J. Generation of mice by transplantation of an adult spermatogonial cell line after cryopreservation. **Cell Proliferation**, v.42, n.2, p.123-31, Apr.2009.

ZHANG, Z.; SHAO, S.; MEISTRICH, M.L. Irradiated mouse testes efficiently support spermatogenesis derived from donor germ cells of mice and rats. **Journal Andrology**, v.27, n.3, p.365-75. May-Jun. 2006.

ZHAO, G. Q.; GARBERS, D. L. Male germ cell specification and differentiation. **Development Cell**, v.5, p.537-47, May. 2002.

ZHAO, S.; ZHU, W.; XUE, S.; HAN, D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. **Cellular Molecular Immunology**, v.11, n.5, p.428-37, Sep.2014.

ZHENG, Y.; HE, Y.; AN, J.; QIN, J.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; TIAN, X.; ZENG, W. THY1 is a surface marker of porcine gonocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v. 26, n.4, p. 533-539, 2014.

ZHENG, Y.; ZHANG, Y.; QU, R.; HE, Y.; TIAN, X.; ZENG, W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. **Reproduction**, v.147, n.3, p.65-74. Feb. 2014.

ZHOU, Q.; NIE, R.; LI, Y.; FRIEL, P.; MITCHELL, D.; HESS, R.A.; SMALL, C.; GRISWOLD, M.D. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: An in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testis. **Biology of Reproduction**, v. 79, n.1, p. 35–42, Jul.2008.

ZOHNI K.; ZHANG, X.; TAN, S.L.; CHAN, P.; NAGANO, M.C. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with Busulfan in mice. **Human Reproduction**, v.27, n.1, p.44-53. 2012.