MARÍLIA DE PAIVA CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS INDIFERENCIADAS E DOS
NICHOS ESPERMATOGONIAIS EM *Astyanax altiparanae* GARUTTI E BRITSKI,
2000 (TELEOSTEI, CHARACIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

São Paulo
2015

MARÍLIA DE PAIVA CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESPERMATOGÔNIAS INDIFERENCIADAS E DOS
NICHOS ESPERMATOGONIAIS EM *Astyanax altiparanae* GARUTTI E BRITSKI,
2000 (TELEOSTEI, CHARACIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Camargo, Marília de Paiva.

Caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000 (Teleostei, Characidae) / Marília de Paiva Camargo. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Borela.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Reprodução de peixes teleósteos.

Versão do título para o inglês: Characterization of undifferentiated spermatogonia stem cell and spermatogonial niches in *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000 (Teleostei, Characidae).

1. Teleostei 2. Morfologia animal 3. Morfometria 4. Espermatogônia indiferenciada 5. Nicho espermatogonial 6. BrdU I. Borela, Profa. Dra. Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0191/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marília de Paiva Camargo.

Título da Dissertação Caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski 2000 (Teleostei, Characidae) .

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Inês Borela.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 77 nas fls. **08** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Inês Borella** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização das espermatogônias tronco e dos nichos espermatogoniais em Astyanax altiparanae* GARUTTI & BRITSKI, 2000 (TELEOSTEI, CHARACIDAE)" do qual participam o(s) aluno(s) **Monica Caroline Pavan Cassel, Lázaro Wender Oliveira de Jesus, Marília de Paiva Camargo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **06.08.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 12 de agosto de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico esta Dissertação à minha mãe, Silvana. Muito mais que minha mãe, minha
melhor amiga e meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Àquele que nunca me abandona, mesmo nos momentos mais difíceis em que penso em desistir e que me mostra, a cada dia, que eu sou capaz, guerreira e que tudo é possível se eu tiver fé, perseverança e força de vontade.

A minha mãe, Silvana. Pessoa a quem me faltam palavras para dimensionar meu amor e minha gratidão. Muito obrigada por segurar em minhas mãos, por mesmo que distante, estar sempre presente em todas as minhas angústias, alegrias e medos. Sem você com certeza eu não teria chegado até aqui e não seria quem sou hoje.

Ao meu namorado, Thiago. Por todo amor, carinho, incentivo e paciência. Obrigada por estar ao meu lado mesmo diante de tanto estresse, dúvidas e preocupações. Obrigada por ser uma pessoa a quem me espelho e que me dá vontade de continuar e ser uma pessoa melhor, sempre.

À minha sogra, Cidinha, que transborda alegria e confiança, me passando energias positivas sempre. Obrigada pelo amor e carinho de sogra, mãe e amiga.

Às minhas melhores amigas, Carol, Letícia, Viviane e Thalyta, pela amizade de tantos anos, por me alegrarem mesmo que virtualmente, por me incentivarem a buscar a vitória e por me mostrarem, dia após dia, que sem nossos momentos, nada teria graça... “Esse é o nosso ano!”.

À Cilmara, minha amiga mesmo que distante, responsável por me passar tranquilidade e confiança de que, em meio aos meus desesperos, eu sou capaz de vencer. Obrigada por toda a ajuda, em todos os momentos importantes da minha vida. Obrigada pela amizade e sintonia inexplicável.

Aos amigos de laboratório e de vida, Giovana, Lázaro, Gisele, Chayrra e Monica por toda a ajuda, incentivo, abraços, desabafos, momentos de alegria e de “gordices”.

Ao técnico Cruz Alberto Mendonza Rigonati, pela ajuda com os blocos, colorações e momentos rotineiros do laboratório. Pelas caronas, bolos, “queijadinhas”, conversas e risadas.

À Monica Cassel, pela colaboração em diversos momentos no decorrer deste projeto, por toda ajuda com as técnicas envolvidas, pelo suporte na estatística e pela paciência. Muito obrigada.

À secretária do departamento, Regina Valbom, por ser solícita e querida em todo o tempo de mestrado, pelo amparo e ombro nos momentos de choro e medo. Muito obrigada por ter se tornado uma amiga!

Ao meu eterno orientador, Fabiano Gonçalves Costa, pela oportunidade, pela confiança que depositou em mim, pela amizade e por toda a ajuda, ao longo de todos esses anos.

Ao professor Sérgio Ferreira de Oliveira, por toda a ajuda, dicas e, especialmente, pela confiança depositada ao me ceder um espaço em seu laboratório para captura das imagens de microscopia de luz.

À professora Patrícia Gama, por ceder seu laboratório para também captura das imagens de microscopia de luz.

Ao Marcos Antonio de Oliveira, pela ajuda com o experimento do BrdU e, por diversas vezes, se demonstrar disponível em sanar minhas dúvidas.

Ao professor Rafael Henrique Nóbrega, pelo incentivo e pelas várias conversas por Skype e por e-mail, saciando minhas dúvidas e por estar sempre disposto a me ajudar.

Ao técnico Sr. Gaspar Ferreira de Lima, por toda a ajuda sempre com muito carinho, pelas conversas e recordações da nossa querida Minas Gerais.

Ao professor Victor Arana Chavez, por ceder seu laboratório e sua confiança para a realização do estudo de microscopia eletrônica.

Aos funcionários da biblioteca por toda ajuda e por permanecerem sempre solícitos em sanar as minhas dúvidas.

Ao pessoal da Estação de Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo – CESP, especialmente ao Danilo Caneppele pela paciência e disponibilidade em ceder os animais para a realização deste estudo. Muito obrigada mesmo!

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, a qual foi essencial para que este trabalho fosse realizado.

E, especialmente, à minha orientadora, Maria Inês Borella, pela confiança, pelos puxões de orelha, conversas formais e informais, momentos de descontração e pela troca mútua de conhecimentos. Obrigada por abrir seus braços e me acolher durante esses anos, mesmo tendo sido eles um pouco conturbados, mas me dando apoio e incentivo para que este grande dia de vitória chegasse.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente para o fim de mais esta etapa em minha vida... Obrigada, de coração.

“Não importa o quanto às vezes seja difícil, o quanto às vezes eu me atrapalhe, o quanto às vezes eu seja a densa nuvem que esconde o meu próprio sol, quantas vezes seja preciso recomeçar: combinei comigo não desistir de mim.”

Ana Jácomo

RESUMO

CAMARGO, M. P. **Caracterização das espermatogônias indiferenciadas e dos nichos espermatogoniais em *Astyanax altiparanae* GARUTTI E BRITSKI 2000 (Teleostei, Characidae).** 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A espermatogênese em peixes é denominada cística, onde as células de Sertoli envolvem e nutrem de forma sincronizada cada clone de células germinativas. As maiores células da linhagem germinativa são as espermatogônias e, são as espermatogônias-tronco, as primeiras células a se diferenciar e dar origem aos espermatozoides, e também, as com capacidade de autorrenovação. Para tanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente as espermatogônias indiferenciadas, as possíveis candidatas às espermatogônias-tronco e os nichos espermatogoniais de *Astyanax altiparanae*, um Characiforme conhecido como lambari-do-rabo-amarelo, o qual é uma espécie de grande valor do ponto de vista econômico e comercial. Quando observadas ao microscópio de luz e eletrônico de transmissão, as espermatogônias indiferenciadas se subdividem em dois tipos, Aund* e Aund. A espermatogônia do tipo Aund* apresentou núcleo irregular, excêntrico, cromatina descondensada e estruturas eletrondensas próximas ao envoltório nuclear e/ou ainda, associadas às mitocôndrias, as *nuages*. A espermatogônia do tipo Aund, apresentou núcleo esférico, central, com cromatina levemente condensada e *nuages*. Análise por meio de morfometria demonstrou uma localização preferencial das espermatogônias indiferenciadas dentro dos túbulos seminíferos, chamada de nicho espermatogonial, sendo que as espermatogônias do tipo Aund* têm preferência a regiões nos túbulos próximas ao interstício, enquanto as do tipo Aund demonstraram preferência às regiões entre dois túbulos (intertúbulo). Adicionalmente, de acordo com a técnica de incorporação e retenção de BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina) foi possível analisar a existência de possíveis candidatas às espermatogônias-tronco, chamadas de "labeling-retaining cells", visto que estas células retiveram BrdU ao longo de todo período avaliado (21 dias), demonstrando um longo ciclo celular, característica esta, de célula-tronco. Estes dados são, portanto, conhecimentos básicos para futuros estudos e aplicações biotecnológicas, como transplante de espermatogônias-tronco, bem como isolamento e diferenciação destas células visando à produção de espermatozoides *in vitro*.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*. Espermatogônia indiferenciada. Morfologia. Morfometria. BrdU.

ABSTRACT

CAMARGO, M. P. **Characterization of undifferentiated spermatogonia and spermatogonial niche in *Astyanax altiparanae* GARUTTI and Britski 2000 (Teleostei, Characidae).** 2015. 60 p. Dissertation (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Spermatogenesis in fish is called cystic where Sertoli cells surround and support synchronously each clone of germ cells. Spermatogonia stem cell is the biggest germ line cell to differentiate and give rise to sperm, and also has the capacity to self-renewal. Therefore, this study aimed to characterize morphologically undifferentiated spermatogonia, possible candidates to spermatogonial stem cells and spermatogonial niche of *Astyanax altiparanae*, a Characiform known as “lambari-do-rabo-amarelo”, which has big economic and commercial value. Using light and transmission electron microscope, undifferentiated spermatogonia are subdivided into two types, Aund* and Aund. The type Aund* spermatogonia presented irregular nucleus, eccentric and decondensed chromatin, and electrondenses structures near the nuclear envelope and/or associated to mitochondria, the *nuages*. The type Aund spermatogonia presented spherical nucleus, central, with slightly condensed chromatin and *nuages*. Morphometric analysis showed a preferential localization of undifferentiated spermatogonia within the seminiferous tubules, called spermatogonial niche, and the type Aund* spermatogonia is located mainly in the tubule regions near to the interstitium, while the type Aund is in the regions between two tubules (intertubule). Additionally, according to the technique of incorporation and retention of BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine) it was possible to examine the existence of possible stem cells candidates through "labeling-retaining cells", since stem cells retained BrdU throughout the entire study period (21 days), demonstrating a long cell cycle. These data are, therefore, basic knowledge for future studies and biotechnological applications such as spermatogonial stem cell transplantation, as well as isolation and *in vitro* differentiation of these cells in order to produce sperm.

Keywords: *Astyanax altiparanae*. Type A undifferentiated. Morphology. Morphometry. BrdU.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A – Compartimentos existentes nos testículos; B – Esquema de uma secção transversal do testículo.	20
Figura 2: Comparação entre testículos de mamíferos (A, camundongo) e peixes (B, <i>zebrafish</i>).....	22
Figura 3: Nicho espermatogonial em <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)..	26
Figura 4: Balanço entre autorrenovação e diferenciação das espermatogônias-tronco..	27
Figura 5: Exemplar macho de <i>Astyanax altiparanae</i>	28
Figura 6: A – Exemplar macho adulto de <i>A. altiparanae</i> com a cavidade celomática aberta. Seta aponta testículo. B – Testículos de <i>A. altiparanae</i>	33
Figura 7: Corte histológico de testículo de <i>A. altiparanae</i> corado pelo Ácido Periódico Reativo de Schiff/Hematoxilina Férrica/Metanil Yellow – Exemplo de como foi feita a morfometria a fim de se analisar a localização preferencial das espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund).	35
Figura 8: Corte histológico de testículo de <i>A. altiparanae</i> corado com Hematoxilina e Eosina (HE)..	39
Figura 9: Corte histológico de testículo de <i>A. altiparanae</i> corado com Azul de Toluidina/Bórax..	40
Figura 10: Corte histológico de testículo de <i>A. altiparanae</i> corado com Ácido-Periódico-Reativo de Schiff/Hematoxilina/MetanilYellow..	41
Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de testículo de <i>A. altiparanae</i>	42
Figura 12: Distribuição dos nichos espermatogoniais de acordo com a adjacência ao interstício ou ao intertúbulo em <i>A. altiparanae</i>	43
Figura 13: Imunodeteção do BrdU.....	45
Figura 14: Capacidade de retenção e perda do BrdU pelas espermatogônias indiferenciadas (Aund) em <i>A. altiparanae</i> demonstrada em porcentagem 4 horas (4h), 1 semana (1s), 2 semanas (2s) e 3 semanas (3s) após o último pulso de BrdU... ..	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. altiparanae – *Astyanax altiparanae*

BrdU – 5'-bromo-2'-deoxiuridina

IC – Interstício

HE – Hematoxilina e Eosina

IT – Intertúbulo

lu – Lúmen tubular

Mi – Mitocôndria

N – Núcleo

ne – *Nuage*

nu – Nucléolo

Se – Célula de Sertoli

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Os teleósteos	18
2.2 Estrutura testicular e espermatogênese nos teleósteos	18
2.3 Espermatogônias indiferenciadas.....	23
2.4 Nicho espermatogonial.....	24
2.5 Espécie modelo: <i>Astyanax altiparanae</i>	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Animais.....	32
4.2 Fixação do material biológico	32
4.3 Processamento histológico	33
4.4 Microscopia de Luz	33
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	34
4.6 Morfometria – Caracterização dos nichos espermatogoniais	34
4.7 Caracterização das “labeling-retaining cells” por meio de incorporação e retenção de BrdU	35
4.8 Análises estatísticas.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Caracterização morfológica das espermatogônias indiferenciadas (possíveis candidatas às espermatogônias-tronco) em <i>Astyanax altiparanae</i>	38
5.2 Nicho espermatogonial em <i>Astyanax altiparanae</i>	43
5.3 Caracterização das “labeling-retaining cells” por meio de incorporação e retenção de BrdU	43
6 DISCUSSÃO.....	47
6.1 Aspectos morfológicos das espermatogônias indiferenciadas	47
6.2 Nicho espermatogonial.....	48

6.3 Possíveis candidatas às espermatogônias-tronco – “labeling-retaining cells”	49
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS*	54

1 INTRODUÇÃO

A espermatogênese em mamíferos é um processo contínuo e estritamente regulado, envolvendo o desenvolvimento de espermatogônias indiferenciadas até a formação dos espermatozoides. Além da autorrenovação das espermatogônias-tronco, a qual irá manter a produção contínua de células germinativas durante toda a vida, a espermatogênese apresenta três eventos distintos: a proliferação e diferenciação espermatogonial, as quais irão amplificar o número de células premeióticas; a meiose dos espermatócitos e, finalmente, a espermiogênese, ou seja, a diferenciação morfológica de espermátides em espermatozoides (HOFMANN, 2008).

A espermatogênese em peixes assemelha-se à de outros vertebrados e, se comparada com os mamíferos, apresenta diferenças pontuais. Em mamíferos, as células de Sertoli sustentam, ao mesmo tempo, as diferentes fases do desenvolvimento de células germinativas e, nos peixes, por outro lado, a espermatogênese ocorre em cistos, chamada espermatogênese cística. Os cistos são formados quando uma espermatogônia isolada (primária ou do tipo A) é completamente envolvida pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (GRIER, 1993; SCHULZ et al., 2010). As células germinativas derivadas destas espermatogônias primárias dividem-se de forma sincrônica devido às pontes citoplasmáticas entre elas, formadas após a citocinese incompleta durante a divisão mitótica e, portanto, constituem um clone de células germinativas, circundado por um número variado de células de Sertoli (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010).

As espermatogônias indiferenciadas, as possíveis candidatas às espermatogônias-tronco, possuem capacidade de se autorrenovar e/ou também de originar células filhas diferenciadas. Estas células estão localizadas em regiões específicas nos túbulos seminíferos dos testículos, chamadas de nichos espermatogoniais. Já foi visto em diversas espécies de mamíferos e recentemente nos teleósteos *zebrafish* (*Danio rerio*), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*), que elas estão próximas ao compartimento intersticial, tendo como influência fatores de crescimento produzidos pelas células somáticas, as células de Sertoli e células de Leydig, bem como influência das células peritubulares mióides e

vasos sanguíneos (COSTA et al., 2012; LACERDA et al., 2013; NÓBREGA et al., 2010; OATLEY; BRINSTER, 2012; OLIVEIRA, 2014).

Para a realização deste estudo, foi utilizado o teleósteo *Astyanax altiparanae* como espécie modelo, um peixe de água doce, pertencente à classe *Actinopteryigi*, ordem *Characiformes* e família *Characidae* (GARUTTI; BRITSKI, 2000), vulgarmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo (PORTO-FORESTI et al., 2001).

Com base nestas informações e, devido à escassez de dados na literatura, este trabalho teve como objetivo caracterizar a morfologia das espermatogônias indiferenciadas por meio de técnicas como a microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, o nicho espermatogonial por meio de morfometria e as possíveis candidatas às espermatogônias-tronco, chamadas de “labeling-retaining cells”, por meio de incorporação e retenção de BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina) em lambari (*A. altiparanae*), uma vez que esta espécie é um Characiforme, táxon com maior número de espécies entre os teleósteos, e também com o maior número de representantes utilizados na aquicultura brasileira.

Os resultados obtidos neste trabalho são, ainda, conhecimentos básicos para futuros estudos e aplicações biotecnológicas na reprodução de peixes, uma área ainda pouco desenvolvida em espécies nativas, como por exemplo, o transplante de espermatogônias-tronco (LACERDA et al., 2010; NÓBREGA et al., 2010; SIQUEIRA-SILVA et al., 2015) e o isolamento e diferenciação de espermatogônias visando à produção de espermatozoides *in vitro* (HONG et al., 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os teleósteos

Os peixes constituem um dos grupos mais abundantes e diversificados dentre os vertebrados, os quais correspondem à metade do número de espécies. São reconhecidas aproximadamente 33.500 espécies de peixes, porém, este número aumenta de forma constante devido à elevada taxa de descrição das mesmas (BALDISSEROTTO; CYRINO; URBINATI, 2014).

Dentre os peixes, os teleósteos apresentam diversas estratégias reprodutivas (VAZZOLER, 1996), como por exemplo, liberação dos gametas para a fertilização externa; o desenvolvimento de órgãos especializados para fertilização interna; os mais variados tipos de comportamento e de cuidado com a prole; e a migração reprodutiva, seja nas formas de piracema ou naquelas acompanhadas por grandes alterações osmóticas, e são capazes de colonizar e reproduzir numa variedade muito grande de microambientes graças a estas adaptações, as quais aperfeiçoaram sua respiração, flutuação, nutrição e, principalmente a reprodução (MOYLE; CECHE Jr, 1996).

Em algumas espécies de teleósteos a reprodução ocorre uma única vez após atingirem a maturidade gonadal, enquanto outras o fazem mais de uma vez. São conhecidas como reprodução sazonal ou descontínua (ocorre de forma gradual e resulta na liberação dos gametas, seja total ou parcelada, em um determinado período do ciclo reprodutivo) e, reprodução contínua (os gametas são produzidos e liberados de forma constante durante todo o ciclo reprodutivo), respectivamente. Esta diferença na reprodução das espécies se dá pelas condições que o ambiente oferece (VAZZOLER, 1996).

2.2 Estrutura testicular e espermatogênese nos teleósteos

Na maioria dos teleósteos, os testículos são órgãos pares, alongados, ligados à parede dorsal do corpo pelo mesórquio e, unem-se na extremidade caudal para formar um único ducto espermático, o qual se abre na papila urogenital, por onde o sêmen é eliminado. Apresentam tamanho similar entre o direito e esquerdo e sofrem modificações morfológicas ao longo do ciclo reprodutivo (COSTA et al., 2014;

GRIER; URIBE-ARANZÁBAL, 2009). E, ainda, de acordo com a organização do compartimento germinativo, os testículos podem ser tubular anastomosado ou lobular (GRIER, 1993; PARENTI; GRIER, 2004).

Os testículos exercem as funções endócrina (função esteroidogênica), a de produção de gametas (função espermatogênica) (SCHULZ et al., 2010), além da função parácrina (SCHULZ et al., 2015). As funções endócrina e parácrina ocorrem no compartimento intertubular ou intersticial e a função de produção de gametas ocorre no compartimento tubular ou germinativo. O compartimento intersticial é constituído de vasos sanguíneos, fibras nervosas, células e fibras do tecido conjuntivo, além de células de Leydig, as quais possuem função esteroidogênica (produção de testosterona e 11-cetotestosterona, conhecida como 11-KT) (KOULISH; KRAMER; GRIER, 2002). Já o comportamento germinativo é constituído pela túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria reveste o túbulo seminífero externamente e sua composição se dá pelas células peritubulares mióides e membrana basal (MATTA et al., 2002).

Somente dois grupos celulares diferentes são encontrados no túbulo seminífero: as células somáticas conhecidas por células de Sertoli e as células germinativas. As células germinativas passarão pela espermatogênese e espermiogênese e darão origem aos espermatozoides (GRIER, 1993; SCHULZ et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1: A – Ilustra os dois compartimentos existentes nos testículos (T) dos teleóteos; o compartimento intersticial (IC) e o germinativo (GC). A área indicada em amarelo corresponde à área do compartimento intersticial. B – Representa um esquema de uma secção transversal do testículo, onde podem ser notados o epitélio germinativo (GE), com as células de Sertoli (SE) e as células germinativas (GC) formando cistos. No lúmen tubular (L) do testículo são encontrados os espermatozoides (SZ). No compartimento intersticial (IC), são encontradas as células peritubulares mióides (M), células de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (BV). A membrana basal (BM) separa o compartimento germinativo do intersticial. (Retirado de Schulz e Nóbrega, 2011¹ apud Oliveira, 2014).

As principais funções das células de Sertoli são de promover a sobrevivência e nutrição das células germinativas, criando assim um microambiente favorável para o desenvolvimento das mesmas. Além disso, as células de Sertoli secretam um fluido que forma o lúmen tubular, e são responsáveis pela fagocitose das células germinativas apoptóticas, corpos residuais descartados por espermatídes durante a espermiogênese e espermatozoides residuais. Portanto, para a função normal do testículo e da espermatogênese, as células de Sertoli são de extrema importância por estarem envolvidas no desenvolvimento das células germinativas dos vertebrados em geral (SCHULZ et al., 2010).

A espermatogênese dos teleósteos assemelha-se ao de outros vertebrados, porém apresenta algumas diferenças pontuais. Em mamíferos, as células de Sertoli

¹ SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. Anatomy and histology of fish testis. **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, v. 1, p. 616–626, 2011.

dão suporte, ao mesmo tempo, a diferentes fases do desenvolvimento de células germinativas, o que pode ser observado na Figura 2A, onde a base da célula de Sertoli dá suporte para a espermatogônia, enquanto sua lateral à espermatócitos e espermatídes iniciais e, a parte adluminal às espermatídes avançadas. A espermatogênese nos peixes, por outro lado, ocorre em cistos, chamada espermatogênese cística. Os cistos são formados quando uma espermatogônia isolada (primária ou do tipo A) é completamente envolvida pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (GRIER, 1993; SCHULZ et al., 2010). As células germinativas derivadas destas espermatogônias primárias dividem-se de forma sincrônica devido às pontes citoplasmáticas entre elas, formadas após a citocinese incompleta durante a divisão mitótica e, portanto, constituem um clone de células germinativas, circundado por um número variado de células de Sertoli (NÓBREGA, BATLOUNI e FRANÇA, 2009; SCHULZ et al., 2010) (Figura 2B).

A espermatogônia indiferenciada se diferencia em espermatogônias diferenciadas as quais após sucessivas divisões mitóticas, espécie-específica, entram em meiose originando espermatócitos primários. Estes, por sua vez, terminam a primeira divisão meiótica formando os espermatócitos secundários, que passam pela segunda divisão meiótica levando a formação das espermatídes. As espermatídes passam pela fase espermiogênica, caracterizada por alterações morfológicas marcantes, principalmente relacionadas com a condensação nuclear e a formação da peça intermediária e flagelo, originando os espermatozoides. Os espermatozoides são células altamente especializadas e equipadas para alcançar e fertilizar os oócitos (MIURA, 1999; SCHULZ et al., 2010). Durante a espermiogênese, as junções das células de Sertoli são desfeitas e as espermatídes ou espermatozoides são liberadas/os, dependendo da espécie, em um lúmen cujo espaço aumenta gradualmente ao longo do período reprodutivo (SCHULZ et al., 2010).

Figura 2: Comparação entre testículos de mamíferos (A, camundongo) e peixes (B, *zebrafish*). Segmentos dos túbulos espermatogênicos são mostrados para ilustrar as diferenças na relação células de Sertoli/células germinativas entre espermatogênese não-cística (A) e cística (B). O epitélio germinativo contém células de Sertoli (SE) e células germinativas, delimitadas por uma lâmina basal (BL) e células peritubulares mióides (MY). As células de Leydig intersticiais (LE) e os vasos sanguíneos (BV) são demonstrados. (A) Espermatogônia (SG); espermatócito (SC); espermatíde arredondada (RST); e espermatíde alongada (EST). (B) Espermatogônia do tipo A indiferenciada (Aund*) (célula-tronco?); espermatogônia do tipo A indiferenciada (Aund); espermatogônia do tipo A diferenciada (Adiff); espermatogônia do tipo B; leptóteno/zigóteno espermatócitos primários (L/Z); paquíteno espermatócitos primários (P); diplóteno espermatócitos/metáfase I (D/MI); espermatócitos secundários/metáfase II (S/MII); jovens (E1), intermediários (E2) e espermatídes finais (E3); espermatozoides (SZ) (Retirado de Schulz et al, 2010).

No entanto, existem outras espécies em que a espermatogênese é chamada de semicística, na qual a espermiogênese é finalizada no lúmen dos túbulos seminíferos após o rompimento dos cistos de espermatídes iniciais (MATTEI; SIAU;

THIAM, 1993). Resultados das pesquisas realizadas em nosso laboratório relatam que a espermatogênese do lambari (*A. altiparanae*) é de forma semicística (COSTA et al., 2014).

2.3 Espermatogônias indiferenciadas

As maiores células do epitélio germinativo com limite celular bem definido são as espermatogônias indiferenciadas (Aund) (LEAL et al., 2009; NÓBREGA et al., 2010; SCHULZ et al., 2010). De acordo com estudos morfológicos, as espermatogônias indiferenciadas possuem núcleo central e volumoso, nucléolo proeminente e cromatina descondensada e, diferentemente dos mamíferos, as espermatogônias nos teleósteos não estão em contato direto com a lâmina basal e, são completamente envolvidas pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (SCHULZ et al., 2010). O citoplasma destas células contém estruturas chamadas de *nuages* próximas ao envoltório nuclear, ou ainda próximas às mitocôndrias, o que forma o cimento intermitocondrial (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006). Estas *nuages* são caracterizadas por suas estruturas eletrondensas de diversos tamanhos, e contém vários tipos de RNAs e proteínas (KNAUT et al., 2000; QUAGIO-GRASSIOTTO; CARVALHO, 1999). As *nuages* não são envoltas por membranas e servem como depósitos de energia para as atividades de RNA (FISHELSOON, 2003).

A distribuição das espermatogônias no compartimento germinativo pode ser de dois tipos. Testículos do tipo espermatogonial restrito, o qual possui as espermatogônias limitadas à porção distal dos lóbulos e o testículo espermatogonial irrestrito, no qual as espermatogônias não possuem localização definida, logo, podem ser encontradas ao longo de toda a extensão dos túbulos seminíferos (GRIER, 1993).

As espermatogônias indiferenciadas (Aund) dão origem às espermatogônias diferenciadas (Adiff), que mantêm algumas das características morfológicas das espermatogônias indiferenciadas, porém, com uma alta queda no potencial de autorrenovação (SCHULZ et al., 2010). Posteriores alterações morfológicas são responsáveis por originar as espermatogônias do tipo B, as quais apresentam maior atividade mitótica, sendo responsáveis por amplificar o número de espermatogônias. Ao final da divisão mitótica, a espermatogônia B se diferencia em espermatócito

primário (pre-leptotênico), dando sequência ao processo espermatogênico descrito anteriormente. Leal e colaboradores (2009) propuseram utilizar a mesma terminologia utilizada em mamíferos para as células germinativas de peixes, uma vez que as informações disponíveis até então mostram semelhança entre o processo espermatogênico de todos os vertebrados.

Em mamíferos, as espermatogônias do tipo A são divididas em: espermatogônias indiferenciadas (A isolada, As; A pareada, Apr, A alinhada, Aal; sendo esta última geralmente clones de 4, 8, ou 16 células), que estão continuamente presentes ao longo do epitélio seminífero; e espermatogônias diferenciadas (A1-A4) que estão presentes em estágios específicos do ciclo gonadal e são responsáveis pela formação dos espermatozoides (DE ROOIJ; RUSSELL, 2000).

Uma subpopulação das espermatogônias do tipo As é considerada como espermatogônia-tronco, sendo capaz de se autorrenovar e/ou originar células filhas diferenciadas (DE ROOIJ; GRISWOLD, 2012). Estas células compreendem apenas 0,3% do total de células germinativas e têm uma localização preferencial nas áreas dos túbulos seminíferos adjacentes ao interstício (CHIARINI-GARCIA; RUSSELL, 2002), geralmente na proximidade dos vasos sanguíneos (YOSHIDA; SUKENO; NABESHIMA, 2007).

Estudos histológicos mais detalhados em *zebrafish* (*Danio rerio*) descreveram dois subtipos de espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund nos testículos, designadas como Aund* e Aund. Porém, não se sabe ainda se estas células estão separadas por mitoses, ou representam diferentes estágios do mesmo ciclo celular (NÓBREGA et al., 2010, SCHULZ et al., 2010).

Além da morfologia das espermatogônias indiferenciadas, o conhecimento sobre a sua possível capacidade “tronco” e consequente cinética do ciclo celular é um aspecto importante para a compreensão da regulação da espermatogênese. Utilizando-se um marcador de proliferação celular, o BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina, o qual é um análogo de timidina e pode ser incorporado ao DNA das células em proliferação durante a fase S do ciclo celular), torna-se possível analisar as candidatas às espermatogônias-tronco, já que estas células têm capacidade de reter BrdU por um longo período de tempo, demonstrando serem células quiescentes, com um longo ciclo celular, característico de células-tronco (LEAL et al., 2009; NÓBREGA et al., 2010; OLIVEIRA, 2014).

2.4 Nicho espermatoγονial

A região onde as espermatogônias indiferenciadas se encontram é chamada de nicho espermatoγονial. Este nicho espermatoγονial é caracterizado por ser um microambiente molecular e celular altamente dinâmico, o qual influencia todos os aspectos e funções destas células, incluindo manutenção, autorrenovação e diferenciação (COSTA et al., 2012). É formado por contribuições de fatores de crescimento das células de suporte somáticas, incluindo as células de Sertoli, células de Leydig e células peritubulares mióides (OATLEY; BRINSTER, 2012).

Sabe-se que em testículos de mamíferos, dos teleósteos *zebrafish* (*Danio rerio*), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e em carpa comum (*Cyprinus carpio*), a localização preferencial das espermatogônias-tronco é nas áreas dos túbulos seminíferos próximas do interstício, em especial de células de Leydig e vasos sanguíneos (COSTA et al., 2012; NÓBREGA et al., 2010; YOSHIDA; SUKENO; NABESHIMA, 2007) (Figura 3).

Figura 3: Nicho espermatogonial em *zebrafish* (*Danio rerio*). As espermatogônias-tronco distribuem-se preferencialmente nas regiões dos túbulos seminíferos próximas ao interstício, adjacentes aos vasos sanguíneos, onde estão localizadas as células de Leydig, as quais possuem função esteroidogênica (LE), vasos sanguíneos (BV) e outros elementos do tecido conjuntivo. (BM) membrana basal; (PM) células peritubulares mióides; (SE) células de Sertoli; (Aund*/Aund) espermatogônias iniciais; (Adiff) espermatogônias diferenciadas; (B early) espermatogônias do tipo B inicial; (B late) espermatogônias do tipo B final; (SZ) espermatozoides; (IC) compartimento intersticial; setas indicam a proximidade das espermatogônias iniciais aos vasos sanguíneos e às células de Leydig. (Adaptado de Nóbrega et al, 2010).

A exata localização e a natureza celular dos nichos espermatogoniais bem como a caracterização das espermatogônias-tronco, têm sido alvo de estudos recentes, porém, já se sabe da importância dos fatores extracelulares, seja na forma de hormônios ou fatores parácrinos, secretados pelas células do nicho espermatogonial, os quais são essenciais na regulação da atividade das espermatogônias-tronco (DE ROOIJ, 2009; NÓBREGA et al., 2015; SCHULZ et al., 2010).

Para tanto, é essencial que haja um balanço entre estes fatores extracelulares, assim como equilíbrio entre os processos de autorrenovação e de diferenciação das espermatogônias-tronco para que haja a continuação da espermatogênese de uma forma regulada (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009).

No entanto, quando há predominância de um processo sobre o outro, a espermatogênese é interrompida, seja pela formação de um seminoma, devido à contínua divisão mitótica das espermatogônias-tronco, seja pelo esgotamento da espermatogênese em função da não reposição destas células (DE ROOIJ, 2006a² apud OLIVEIRA, 2014; DE ROOIJ, 2006b) (Figura 4).

² DE ROOIJ, D. G. Regulation of spermatogonial stem cell behavior in vivo and in vitro. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 130–134, 2006a.

Figura 4: Balanço entre autorrenovação e diferenciação das espermatogônias-tronco. Situações extremas que modificam o balanço no sentido da autorrenovação ou da diferenciação, interrompem a espermatogênese devido à formação de um seminoma (câncer testicular), ou pela depleção da espermatogênese, respectivamente (Adaptado de Oliveira, 2014).

2.5 Espécie modelo: *Astyanax altiparanae*

O Brasil apresenta um dos maiores potenciais para a piscicultura, no cenário mundial, possuindo disponibilidade de recursos hídricos e extensão territorial com 75% de seu território em área tropical e uma ictiofauna rica em opções para a reprodução e criação em cativeiro (HAZIN, 2006).

Entre as espécies nativas, os lambaris do gênero *Astyanax ssp* são espécies com potencial para a piscicultura, pois são peixes comumente utilizados como petisco e isca para a pesca esportiva. Em cultivo, aceitam rações artificiais, já sendo estudados e produzidos em cativeiro (HAYASHI et al., 2004).

Possuem ampla distribuição geográfica, sendo encontrados desde o sudoeste dos Estados Unidos até a Bacia do rio da Prata (MOREIRA FILHO, 1989), inclusive na sub-bacia do rio Pomba e bacia do rio Paraíba do Sul (PAIVA; DERGAM; MACHADO, 2006).

Porém, a espécie *Astyanax altiparanae* não havia sido descrita até 2000, quando revisões sistemáticas e filogenéticas, realizadas no gênero *Astyanax*, verificaram que o *Astyanax bimaculatus* não correspondia à consideração de uma

única espécie, tendo sido então dividido em duas espécies: *Astyanax altiparanae* e *Astyanax bimaculatus* (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

O *A. altiparanae* (Figura 5) espécime utilizada para a realização deste estudo, pertence à classe *Actinopteryigi*, ordem *Characiformes* e família *Characidae* (GARUTTI, BRITSKI, 2000), vulgarmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo.

Figura 5: Fotografia de um exemplar macho de *Astyanax altiparanae*. Retirado de <http://fishbase.org>

É uma espécie de pequeno porte, atingindo de 7 a 15 cm de comprimento, podendo alcançar 60 gramas de peso. Seu crescimento é rápido, chegando à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade em condições de cultivo, normalmente com 7 a 9 cm de comprimento para os machos e 12 a 15 cm de comprimento para fêmeas (PORTO-FORETI et al., 2001).

São encontrados em cabeceiras de riachos, rios e lagos, e vivem sempre em cardumes, realizando curtas migrações na época das cheias para sua reprodução e considerados onívoros, se alimentando de algas, vegetais, sementes, larvas e insetos adultos (CEMIG/CETEC, 2000; VITULE; ARANHA, 2002).

Diversos são os relatos sobre a importância do lambari na estrutura trófica do ecossistema e sua variação alimentar diante de modificações ambientais (ESTEVES, 1998; MOTTA; UIDA, 1995; SUAREZ; SOUZA; PEREIRA, 1995).

A ecologia alimentar de uma determinada espécie faz parte e interfere diretamente na dinâmica de sua população, sendo primordial para a conservação do ecossistema como um todo (VITULE; ARANHA, 2002). Os lambaris são de extrema importância em diversos habitats por equilibrarem o ecossistema e a cadeia alimentar, constituindo-se em fonte de alimentos para peixes maiores, carnívoros e aves.

Também são muito cultivados nas pisciculturas brasileiras pela destacada importância econômica, dado o seu volume de captura, e pela pesca esportiva (BARBIERI; SANTOS; SANTOS, 1982), sendo utilizada para o consumo direto, para a industrialização na forma de conservas, como alimento de forragem na criação de peixes carnívoros e ainda ser comercializado como isca viva para a pesca esportiva, entre outras possibilidades.

O dimorfismo sexual em *A. altiparanae* está presente principalmente durante o período reprodutivo, no qual as diferenças morfológicas nítidas ficam mais evidenciadas entre os machos e as fêmeas. As fêmeas, além de serem maiores e possuírem o corpo mais arredondado, são frequentemente mais precoces no crescimento do que os machos (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005; SATO et al., 2006). Neste período, observa-se ainda nas fêmeas, uma forte irrigação por vasos sanguíneos na região ventral do corpo, principalmente nas bases de inserção das nadadeiras peitorais e ventrais. Os machos são menores, possuem o corpo alongado e, no período reprodutivo, apresentam a nadadeira anal áspera ao toque, sendo tal característica importante para a sua identificação (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005), resultado de inúmeras espículas que aparecem na época da reprodução (CEMIG/CETEC, 2000).

Dados sobre o período reprodutivo de *A. altiparanae* são bastante divergentes na literatura. Barbieri e colaboradores (1982) e Santos (1995) afirmaram que a primavera é o período reprodutivo desses animais. Por outro lado, Agostinho e colaboradores (1984) sugeriram o período de novembro a fevereiro para ocorrência da desova destas espécies e que a mesma ocorre de forma parcelada.

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o testículo de *A. altiparanae* é classificado como tubular anastomosado, onde são encontradas duas porções com diferentes funções, denominadas de espermatogênica e secretora (COSTA et al., 2014).

A escolha desta espécie para o presente estudo se deu pelos diversos fatores citados anteriormente, pois, além de ser de extrema importância em diversos habitats por equilibrar o ecossistema e a cadeia alimentar, também é muito cultivado nas pisciculturas brasileiras pela destacada importância econômica, dado o seu volume de captura (BARBIERI; SANTOS; SANTOS, 1982). Outros fatores importantes como sua fácil localização e manuseio em função de seu pequeno porte, também contribuem para esta escolha. Adicionalmente, tem sido alvo de

vários estudos de nosso grupo de pesquisa que visam caracterizar os aspectos celulares, moleculares e hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-gônada deste Characiforme.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Os estudos relacionados sobre a biologia das espermatogônias-tronco e de seus nichos espermatogoniais em peixes são recentes e, pouco se conhece sobre as propriedades destas células em se autorrenovar e/ou diferenciar, os quais são aspectos essenciais para a continuidade da espermatogênese e formação de espermatozoide maduro.

Este projeto, portanto, teve como objetivo geral caracterizar morfológicamente as espermatogônias indiferenciadas (possíveis candidatas às espermatogônias-tronco), e a distribuição dos nichos espermatogoniais de *A. altiparanae*, espécie de Characiforme e táxon com maior número de espécies entre os teleósteos e também com o maior número de representantes utilizados na aquicultura brasileira.

Ademais, são conhecimentos básicos para futuros estudos e aplicações biotecnológicas na reprodução de peixes, uma área ainda pouco desenvolvida em espécies nativas.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a morfologia das espermatogônias indiferenciadas por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Caracterizar e analisar a distribuição preferencial dos nichos espermatogoniais ao longo do testículo por meio de morfometria.
- Caracterizar e analisar as espermatogônias indiferenciadas pela técnica de incorporação e retenção de BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina) por longo período de tempo ("labeling-retaining cells").

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a caracterização morfológica e morfométrica das espermatogônias indiferenciadas (possíveis candidatas às espermatogônias-tronco) e para a distribuição dos nichos espermatogoniais foram coletados vinte exemplares ($n=20$) sexualmente maduros de lambari (*A. altiparanae*) em estágio regredido na Estação de Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo – CESP, localizada na cidade de Paraibuna, São Paulo (23°24'51"S, 45°35'59"W).

Este estágio do ciclo reprodutivo foi escolhido uma vez que dados recentes do nosso grupo de pesquisa verificaram que em *A. altiparanae*, “regredido” é o estágio em que o epitélio germinativo apresenta maior número de espermatogônias circundadas por células de Sertoli, sendo encontrados poucos cistos em outras fases da espermatogênese (COSTA et al., 2014).

Todo o procedimento experimental usado estava de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo #77/2013) e dentro da legislação do CONCEA.

4.2 Fixação do material biológico

Os animais foram anestesiados com solução de benzocaína (0,1 g/L), então procedida a biometria dos mesmos, na qual foram mensurados o comprimento total e comprimento padrão, em milímetros, e o peso corporal, em gramas, utilizando-se uma balança com precisão de 0,001g. A medula espinhal de cada animal foi seccionada, as cavidades celomáticas foram expostas e os testículos dissecados, conforme mostram as imagens 6A e 6B. Após a retirada dos testículos, os mesmos foram pesados, fragmentados e fixados por imersão em diferentes fixadores: Methacarn (70% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por um período de 6 horas, para imuno-histoquímica; e Karnovsky (solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, 0,1M a pH 7,2) para histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente,

por um período de no mínimo 24 horas e mantidos em geladeira a 4° até o processamento histológico.

Após a fixação dos fragmentos de testículo em Methacarn, estes foram mantidos em álcool 70% até o processamento histológico.

Figura 6: A – Exemplar macho adulto de *A. altiparanae* com a cavidade celomática aberta. Seta aponta testículo. B – Testículos de *A. altiparanae*.

4.3 Processamento histológico

Os materiais fixados em Methacarn foram desidratados em séries alcoólicas de concentração crescente, submetidos à diafanização em xilol e em seguida incluídos em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com 5 µm de espessura.

Os materiais fixados em Karnovsky destinados à microscopia de luz, foram incluídos em historesina (Leica) e posteriormente obtidos cortes de 3 µm de espessura, de acordo com procedimentos usuais.

4.4 Microscopia de luz

Para a caracterização morfológica das espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund), as lâminas contendo os cortes em parafina e historesina foram submetidas a três diferentes corantes: Hematoxilina/Eosina (HE); Azul de Toluidina/Bórax e pelo Ácido Periódico – Reativo de Schiff (PAS)/Hematoxilina/MetanilYellow, segundo o protocolo de Quintero-Hunter, Grier e Muscato, 1991.

Após a montagem em lamínula, as mesmas foram analisadas e fotodocumentadas em microscópio de luz Axioskop 2 (Zeiss Inc, USA), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Zeiss Inc – USA), equipado com dispositivo de captura de imagem digital ZEN 2012.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os fragmentos dos testículos fixados em Karnovsky foram lavados em Tampão Fosfato a 0,1M, pós-fixados no escuro em 1% de tetróxido de ósmio em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2), contrastados em bloco com solução aquosa de 5% de uranila e desidratados em acetona.

Após este processo, as amostras foram infiltradas com solução de resina Epon por 5 horas e incluídas em formas de silicone. A resina foi polimerizada a 60 °C e, após seleção das áreas de interesse, por análise de cortes semifinos e coloração com Azul de toluidina, as amostras selecionadas foram seccionadas em ultramicrotomo equipado com navalha de diamante para obtenção de cortes ultrafinos, os quais foram contrastados com solução saturada de acetato de uranila em 50% de álcool e citrato de chumbo.

Os cortes foram analisados e foto-documentados ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010 (Jeol Inc., Japão) equipado com dispositivo de captura de imagem digital Gatan, com câmera SC1000 Orius acoplada (Gatan Inc., USA).

4.6 Morfometria – Caracterização dos nichos espermatogoniais

Para determinar o nicho espermatogonial de *A. altiparanae*, foi observada a distribuição espacial das espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund* e Aund, de acordo com a sua adjacência ao compartimento intersticial, ou em contato com um ou mais túbulos (intertúbulo) (Figura 7). 500 espermatogônias indiferenciadas foram contadas por animal e suas distribuições preferenciais foram calculadas a partir da porcentagem do total de células contadas. Esta metodologia foi empregada de acordo com Nóbrega et al. (2010).

Figura 7: Corte histológico de testículo de *A. altiparanae* corado pelo Ácido Periódico – Reativo de Schiff (PAS)/Hematoxilina Férrica/Metanil Yellow – Exemplo de como foi feita a morfometria a fim de se analisar a localização preferencial das espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund). Área circulada: compartimento intersticial do túbulo seminífero; Seta: região entre dois túbulos seminíferos (intertúbulo). Barra: 10 μ m.

4.7 Caracterização das “labeling-retaining cells” por meio de incorporação e retenção de BrdU

Para a realização deste experimento, foi realizada uma nova coleta de *A. altiparanae* (n=20) os quais estavam em maturação média do período reprodutivo, em setembro de 2014, na Estação de Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo – CESP, localizada na cidade de Paraibuna, São Paulo. Os animais ficaram aproximadamente 90 dias em processo de aclimação em um aquário com capacidade para 30 litros e, o mesmo, possuía sistema de aeração junto com filtragem da água. A limpeza dos filtros era realizada em até três dias. A temperatura da água ficou em torno de 28 °C e os animais recebiam ração a cada dois dias.

Os animais receberam pulsos de BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina) na concentração de 150 mg/kg duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas entre cada pulso, durante três dias consecutivos. Os mesmos (n=5 por período de tempo avaliado) foram sacrificados com 4 horas, 1 semana, 2 e 3 semanas (4h, 1s, 2s, 3s respectivamente) logo após receberem o último pulso de BrdU. Os testículos foram fixados em Methacarn por 6 horas em temperatura ambiente, processados,

incluídos em parafina, seccionados com 5 µm e submetidos à imunodeteção de BrdU.

Para tanto, os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série alcoólica, lavados em água corrente e em tampão tris salino com Tween-20 0.05% (TBS-T pH 7.2). A recuperação antigênica foi feita com ácido periódico 1% por 30 minutos a 60°C, esfriando na mesma solução por mais 10 minutos e então foram lavados em TBS-T. Para os bloqueios de peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, foram utilizadas as soluções Hydrogen peroxidase block e Protein block, respectivamente, do Kit Spring Reveal - Biotin-Free Polyvalent DAB (SPD-125). Os bloqueios foram de 30 minutos e uma hora, respectivamente.

Então, as lâminas foram incubadas por uma hora, em câmara úmida, a temperatura ambiente utilizando o anticorpo primário Anti-BrdU (1:80) [clone BU-33: B8434, Sigma]. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em TBS-T e foi realizado o tratamento conforme estabelecido na bula do Kit Spring Reveal [Complement + Conjugate]. Os cortes foram novamente lavados em TBS-T e revelados com 3-3' Diaminobenzidina (DAB). Em seguida, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer, diferenciados em carbonato de lítio e lavados em água corrente. Por fim, o material foi desidratado, montado e analisado em microscópio de luz (Axioskop 2, Zeiss Inc., USA). Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por TBS-T em alguns cortes.

A porcentagem de células BrdU-positivas para as espermatogônias indiferenciadas (Aund) foram determinadas pela contagem do número de células marcadas no total de células avaliadas (positivas e negativas ao BrdU) durante os diferentes períodos de tempo após o último pulso de BrdU.

A contagem das espermatogônias indiferenciadas foi realizada de uma forma geral, abrangendo as duas células como "Aund", sem diferenciá-las em Aund* e Aund. Isto se deu devido à espessura dos cortes, já que os mesmos não permitiram uma avaliação da exata morfologia, necessária para a discriminação de tais células.

4.8 Análises estatísticas

Para determinar o nicho espermatogonial, foi observada a distribuição espacial das espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund* e Aund de acordo com a sua adjacência ao compartimento intersticial ou se em contato com um ou mais

túbulos (intertúbulo). Estes dois parâmetros foram analisados por teste t, com nível de significância de $p \leq 0,05$.

Já com relação à técnica de incorporação e retenção de BrdU, os diferentes tempos amostrais (4h, 1s, 2s e 3s) foram analisados utilizando ANOVA seguida por teste t, com nível de significância de $p \leq 0,05$.

O programa Systat 10 foi utilizado para todas as análises estatísticas.

Ambas as análises estatísticas foram demonstradas por meio do gráfico Boxplot, o qual tem como objetivo principal mostrar a distribuição gráfica de dados existentes em uma determinada variável. Além de fornecer informações importantes sobre um conjunto de dados, o Boxplot é usado para comparar graficamente mais de um conjunto de medidas com respeito à média, dispersão e distribuição. Isso é possível a partir do posicionamento dos Boxplots para cada conjunto de dados paralelamente num mesmo gráfico.

No presente trabalho, o Boxplot foi representado por um retângulo alinhado verticalmente com duas semirretas, uma em cada um dos lados opostos do retângulo. O centro da distribuição foi indicado pela linha da mediana. A dispersão foi representada pela altura do retângulo (quartis 1 e 3). O retângulo contém 50% dos valores do conjunto de dados. A posição da linha mediana no retângulo informa sobre a assimetria da distribuição. Uma distribuição simétrica teria a mediana no centro do retângulo. Se a mediana é próxima de Q1 então os dados são positivamente assimétricos. Se a mediana é próxima de Q3 os dados são negativamente assimétricos. Quanto às hastes inferiores e superiores, estas se estendem, respectivamente, do quartil inferior até o menor valor não inferior ao limite inferior e do quartil superior até o maior valor não superior ao limite superior. Por fim, valores extremos (*outliers*) são representados por um zero (°) ou por um asterisco (*).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica das espermatogônias indiferenciadas (possíveis candidatas às espermatogônias-tronco) em *Astyanax altiparanae*

No presente trabalho, por meio de análises morfológicas à microscopia de luz, utilizando-se os corantes Hematoxilina e Eosina (HE) (Figura 8); Azul de Toluidina/Bórax (Figura 9) e pelo Ácido Periódico – Reativo de Schiff (PAS)/Hematoxilina Férrica/Metanil Yellow (Figura 10) e à microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 11), dois tipos de espermatogônias indiferenciadas foram observadas, sendo elas espermatogônia indiferenciada do tipo Aund* e espermatogônia indiferenciada do tipo Aund.

As espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund* são células volumosas (CC = $19.707 \pm 3.111 \mu\text{m}$) e completamente envoltas pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (uma a duas células de Sertoli envolvem uma Aund*) (Figuras 8A – D; Figuras 9A – D; Figuras 10A – D). Apresentam citoplasma claro e abundante, conteúdo retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, mitocôndrias e *nuages*, caracterizadas por serem estruturas eletrondensas, próximas ao envoltório nuclear e/ou associadas às mitocôndrias (Figuras 11A – B e E). Este tipo celular apresentou núcleo irregular (CN = $10.745 \pm 1.176 \mu\text{m}$) e, na maioria das vezes, excêntrico com um ou dois nucléolos proeminentes, além da cromatina descondensada (Figuras 8A, C; Figuras 9A, C; Figuras 10A, C). Uma característica importante destas células foi em relação à sua localidade dentro do testículo, já que a maioria pode ser observada próxima ao interstício (73.7%; $t = 8.545$ / $p = 0.001$; Figura 12).

As espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund, são menores quando comparadas com as do tipo Aund* (CC = $16.975 \pm 2.986 \mu\text{m}$; $t = -4.480$ / $p < 0.001$). Elas podem estar isoladas, envoltas pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, como também próximas a outra espermatogônia indiferenciada, quando estas estiverem comprometidas com a diferenciação celular no processo espermatogênico (Figuras 8B, D; Figuras 9B, D; Figuras 10B, D). Estas células apresentam menor quantidade de citoplasma, contendo retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e as *nuages* próximas ao envoltório nuclear e/ou associadas às mitocôndrias. Em relação ao núcleo, este é menor se comparado com

o núcleo da espermatogônia indiferenciada do tipo Aund* (CN = $9.573 \pm 1.202 \mu\text{m}$; $t = -4.930$ / $p < 0.001$). Além disso, é regular e mais central, com cromatina levemente condensada, e contém um ou dois nucléolos proeminentes (Figuras 11C – D e F). E, em relação à sua localidade dentro do testículo, a maioria deste tipo celular foi encontrada próxima a outro túbulo seminífero (intertúbulo) (Figura 12).

Figura 8: Corte histológico de testículo de *A. altiparanae* corado com Hematoxilina e Eosina (HE). A e C: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund* - núcleo irregular, excêntrico, cromatina descondensada e um ou dois nucléolos proeminentes. B e D: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund - núcleo esférico, central, cromatina levemente condensada e um ou dois nucléolos proeminentes. (Barras: 10 μm).

Figura 9: Corte histológico de testículo de *A. altiparanae* corado com Azul de Toluidina/Bórax. A e C: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund* - núcleo irregular, excêntrico, cromatina descondensada e um ou dois nucléolos proeminentes. B e D: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund - núcleo esférico, central, cromatina levemente condensada e um ou dois nucléolos proeminentes. (IC) interstício; (IT) intertúbulo. (Barras: 10 µm).

Figura 10: Corte histológico de testículo de *A. altiparanae* corado com Ácido-Periódico-Reativo de Schiff/Hematoxilina/MetaniilYellow. A e C: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund* - núcleo irregular, excêntrico, cromatina descondensada e um ou dois nucléolos proeminentes. B e D: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund - núcleo esférico, central, cromatina levemente condensada e um ou dois nucléolos proeminentes. (IC) interstício; (IT) intertúbulo. (Barras: 10 µm).

Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de testículo de *A. altiparanae*. A, B e E: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund* - núcleo irregular, excêntrico, e cromatina descondensada. Citoplasma claro e abundante, contendo retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e *nuages* (Barras: 20 µm; 5 µm e 5 µm, respectivamente). C, D e F: Espermatogônia indiferenciada do tipo Aund - núcleo esférico, central, cromatina levemente condensada. Menor quantidade de citoplasma, contendo retículo endoplasmático rugoso e *nuages* (Barras: 20 µm, 5 µm e 5 µm, respectivamente). (N) núcleo; (nu) nucléolo; (mi) mitocôndria; (ne) *nuage*; (IC) interstício; (IT) intertúbulo; (RER) retículo endoplasmático rugoso; (Se) célula de Sertoli.

5.2 Nicho espermatogonial em *Astyanax altiparanae*

Uma informação que pode ser relevante em relação às espermatogônias indiferenciadas é a sua localidade nos túbulos seminíferos. A região onde estas células se encontram é chamada de nicho espermatogonial, podendo esta ser adjacente ao interstício ou a outro túbulo seminífero (intertúbulo).

No presente estudo, por meio da contagem das células em relação à adjacência ao interstício ou ao intertúbulo, as espermatogônias indiferenciadas apresentaram localidades distintas.

As espermatogônias do tipo Aund são mais frequentes próximas ao intertúbulo (79,6%; $t = -21,440$, $p < 0,001$), enquanto as do tipo Aund* estão mais frequentes próximas ao interstício (73,7%; $t = 8,545$, $p = 0,001$) (Figura 12).

Figura 12: Distribuição dos nichos espermatogoniais de acordo com a adjacência ao interstício ou ao intertúbulo em *A. altiparanae*. As espermatogônias do tipo Aund são mais frequentes próximas ao intertúbulo (79,6%; $t = -21,440$, $p < 0,001$) enquanto as espermatogônias do tipo Aund* estão mais presentes na proximidade ao interstício (73,7%; $t = 8,545$, $p = 0,001$). Os asteriscos presentes no gráfico representam *outliers*.

5.3 Caracterização das “labeling-retaining cells” por meio de incorporação e retenção de BrdU

Com base nas análises imuno-histoquímicas foi possível observar dois grupos distintos a partir da incorporação e retenção de BrdU (Figuras 13 e 14). Assim, houve diferença significativa entre o tratamento de 4 horas com os de 2 e 3 semanas (4h-2s: $t = 7,236$; $p=0,002$ / 4h-3s: $t = 4,357$; $p=0,012$), da mesma forma que o tratamento de 1 semana com os de 2 e 3 semanas (1s-2s: $t = 4,443$; $p=0,011$ / 1s-3s: $t = 6,206$; $p=0,03$). No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos de 4 horas e 1 semana, nem entre os de 2 e 3 semanas, como descrito abaixo.

Entre os animais correspondentes ao primeiro grupo, estão os que foram coletados nas primeiras 4 horas e 1 semana após o último pulso de BrdU ($t = -1,486$; $p=0,211$). Histologicamente, os animais coletados nas primeiras 4 horas (4h) apresentaram somente as espermatogônias indiferenciadas e os cistos espermatogênicos marcados (Figura 13A). Já os animais coletados com 1 semana (1s), além das espermatogônias e dos cistos espermatogênicos, espermatozoides também apresentaram esta marcação devido à divisão celular normal do processo espermatogênico (Figura 13B).

Entre os animais correspondentes ao segundo grupo, estão os que foram coletados 2 e 3 semanas após o último pulso de BrdU ($t = 1,189$; $p=0,300$). Nos cortes feitos com as amostras da segunda semana de coleta (2s), foi possível observar uma perda de retenção ao BrdU entre os cistos espermatogênicos (Figura 13C) e, na terceira semana de coleta (3s), dentre as células germinativas, somente as espermatogônias indiferenciadas (isoladas – Aund*; isoladas ou próximas à outra espermatogônia indiferenciada – Aund), retiveram fortemente o BrdU, havendo perda de retenção entre os cistos espermatogênicos e espermatozoides (Figura 13D). Foi possível observar espermatozoides ainda marcados, devido à divisão celular e passagem do material para as células filhas durante o processo espermatogênico.

Além destes resultados, ainda na terceira semana de coleta, pôde-se observar espermatogônias indiferenciadas com diferentes marcações, levando-se a crer que as mesmas apresentam uma cinética diferente em relação à perda de BrdU. Algumas espermatogônias indiferenciadas ainda apresentaram uma forte

marcação após os 21 dias, enquanto em outras foi possível observar que o BrdU se diluiu mais rapidamente.

Figura 13: A: Espécimes coletados com 4 horas: marcação somente nas espermatogônias indiferenciadas (seta; inset) e nos cistos espermatogênicos (*); B) Espécimes coletados com 1 semana: além das espermatogônias indiferenciadas (seta; inset) e dos cistos espermatogênicos (*), houve marcação nos espermatozoides (Sz); C) Espécimes coletados com 2 semanas: marcação em espermatogônias indiferenciadas (seta; inset) e espermatozoides (Sz), e perda de retenção ao BrdU entre os cistos espermatogênicos (*); D) Espécimes coletados com 3 semanas: marcação em espermatogônias indiferenciadas (seta; inset), e perda de retenção ao BrdU entre os cistos espermatogênicos (*) e espermatozoides (Sz).

Figura 14: Capacidade de retenção e perda do BrdU pelas espermatogônias indiferenciadas (Aund) em *A.altiparanae* demonstrada em porcentagem 4 horas (4h), 1 semana (1s), 2 semanas (2s) e 3 semanas (3s) após o último pulso de BrdU. Os símbolos ° e *, presentes no gráfico, representam outliers.

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos morfológicos das espermatogônias indiferenciadas

Conhecimentos sobre as espermatogônias indiferenciadas, as possíveis candidatas às espermatogônias-tronco, bem como a localização das mesmas nos túbulos seminíferos e suas características morfofuncionais e moleculares são, ainda, incipientes em mamíferos, e ainda mais em peixes (NÓBREGA et al., 2010; SCHULZ et al., 2010).

Com base em estudos já realizados em mamíferos e, também, nas características morfológicas das espermatogônias, como por exemplo, a morfologia nuclear, número e disposição de nucléolos, tipo e padrão de distribuição de cromatina, uma nova terminologia espermatogonial foi proposta para os teleósteos, a partir de estudos realizados em *zebrafish* (*Danio rerio*) (LEAL et al., 2009; NÓBREGA et al., 2010; SCHULZ et al., 2010).

Uma vez tendo a terminologia estabelecida para teleósteos, a mesma foi empregada para este estudo, utilizando-se o lambari (*A. altiparanae*) como espécie modelo. De acordo com a morfologia das espermatogônias indiferenciadas, bem como as características nucleares e condensação da cromatina, pôde-se observar os dois tipos de espermatogônias indiferenciadas: Aund* e Aund, ambas possíveis candidatas à espermatogônias-tronco.

Em estudos realizados por Leal e colaboradores (2009), os dois tipos de espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund) foram observados em *zebrafish* (*Danio rerio*). Com base na morfologia destas células, ambas se diferem das demais células da linhagem germinativa, pois são completamente envolvidas pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli e são as maiores células germinativas (~677 μm^3), além de apresentarem um núcleo grande de 8,6 μm de diâmetro, cromatina pouco condensada e um ou dois nucléolos proeminentes nesta espécie. Este grupo observou, ainda, que a espermatogônia indiferenciada do tipo Aund* contém um envelope nuclear irregular e a relação núcleo/citoplasma é maior em relação às outras espermatogônias.

Da mesma forma, Nóbrega e colaboradores (2010), com base em estudos relacionados com o nicho espermatogonial e com transplante de espermatogônia-tronco também em *zebrafish* (*Danio rerio*), também caracterizaram estes dois tipos

de espermatogônias indiferenciadas com morfologias distintas, Aund* e Aund, assim como em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (LACERDA; COSTA; FRANÇA, 2014; OLIVEIRA et al., 2014), dados estes que corroboram com os resultados aqui descritos em *A. altiparanae*.

Outra característica observada nas espermatogônias indiferenciadas de *A. altiparanae* tanto na microscopia de luz e, principalmente, na microscopia eletrônica de transmissão, é que em seu citoplasma podem ser vistas as *nuages*, também conhecidas como “cimento intermitocondrial” (BATLOUNI; ROMAGOSA; BORELLA, 2006), localizadas próximas ao envoltório nuclear e/ou ainda, associadas às mitocôndrias. Estas *nuages* são caracterizadas por suas estruturas amorfas e eletrondensas de diversos tamanhos, formadas por vários tipos de RNAs e proteínas (COSTA et al., 2014; KNAUT et al., 2000) e, representam uma característica geral de espermatogônias indiferenciadas. Estas estruturas podem ser necessárias para a diferenciação e/ou determinação das espermatogônias indiferenciadas (BRAAT; SPENKSNIJDER; ZIVKOVIC, 1999).

Em estudos recentes de nosso laboratório realizados por Melo-Dias (2015) em curimatá (*Prochilodus lineatus*), as características morfológicas das espermatogônias indiferenciadas, chamadas de espermatogônias primárias, são semelhantes às aqui descritas. No entanto, neste trabalho, não há a descrição de dois tipos de espermatogônias indiferenciadas, como citado anteriormente.

Embora existam diferenças morfológicas entre as espermatogônias indiferenciadas, o que permite classificá-las em Aund* e Aund em *A. altiparanae*, assim como em *zebrafish* (*Danio rerio*), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e em carpa comum (*Cyprinus carpio*), não se sabe se as mesmas são separadas por mitose ou, se ainda, representam estágios diferentes de um mesmo ciclo celular (LACERDA; COSTA; FRANÇA, 2014; NÓBREGA et al., 2010; OLIVEIRA, 2014).

6.2 Nicho espermatogonial

Assim como a morfologia celular, torna-se essencial o conhecimento sobre a localização das espermatogônias indiferenciadas nos túbulos seminíferos, visto que a região onde estas células se encontram, chamada de nicho espermatogonial, desempenha um papel crucial no destino das mesmas. Além disto, o conhecimento

deste nicho espermatogonial serve como base fundamental para o entendimento do processo espermatogênico bem como os fatores que o regulam.

As células irão se autorrenovar, entrar em quiescência, ou se diferenciar, com base em sua estrutura e dos fatores produzidos e secretados pelo nicho (OATLEY; BRINSTER, 2012).

No entanto, os dados sobre o nicho espermatogonial e sua composição molecular e celular encontram-se incipientes, tanto em mamíferos quanto em peixes.

Em estudos realizados com mamíferos como o *Tayassu tajacu* (CAMPOS-JUNIOR et al., 2012) e em equídeos (COSTA et al., 2012) assim como em *zebrafish* (*Danio rerio*) em estudos feitos por Nóbrega e colaboradores (2010), a localização preferencial das espermatogônias indiferenciadas (possíveis candidatas às espermatogônias-tronco) situa-se nas áreas dos túbulos seminíferos próximas ao interstício, em especial nas proximidades de células de Leydig, vasos sanguíneos e células endoteliais (COSTA et al., 2012; NÓBREGA et al., 2010; YOSHIDA; SUKENO; NABESHIMA, 2007).

A localização dos nichos espermatogoniais na base do epitélio germinativo está relacionada à maior concentração de andrógenos, o qual estimula o estado indiferenciado das espermatogônias (ZHANG; SHAO; MEISTRICH, 2007)

Devido à localidade do nicho espermatogonial ser próxima a vasos sanguíneos, isto indica, provavelmente, o envolvimento das células endoteliais na regulação da função das espermatogônias-tronco, visto que as células endoteliais dão suporte à expansão de células-tronco normais ou malignas, não somente pela distribuição de oxigênio e nutrientes, mas também pela liberação parácrina de fatores de crescimento (NÓBREGA et al., 2010).

A mesma localização das espermatogônias indiferenciadas, ou seja, próximas ao interstício, foi encontrada em tilápia (*Oreochromis niloticus*) (LACERDA; COSTA; FRANÇA, 2014) e em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (OLIVEIRA, 2014).

6.3 Possíveis candidatas às espermatogônias-tronco – “labeling-retaining cells”

Uma técnica bastante eficaz a fim de se analisar a possível existência de candidatas às espermatogônias-tronco, é a incorporação e consequente retenção de BrdU (5'-bromo-2'-deoxiuridina), das células germinativas, em especial as

espermatogônias indiferenciadas. Este composto sintético é um marcador de células em proliferação, análogo à timidina, o qual se incorpora na fase S do ciclo celular, ou seja, na fase em que há a duplicação do material genético (NÓBREGA et al, 2010).

Com base na literatura e após a análise dos nossos dados, acredita-se que provavelmente as células mais quiescentes são as espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund*, e as mais ativas, as espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund. Ambas são caracterizadas como as “labeling-retaining cells” pela capacidade de reter o BrdU ao longo de todo o período avaliado e possuir um longo ciclo celular (21 dias).

Dentre as espermatogônias indiferenciadas, existem as que possuem potencial de células-tronco, com capacidade de se autorrenovar, entrar em quiescência e, de se diferenciar. Estas células, por sua vez, apresentam ciclos celulares mitóticos mais longos se comparados ao de outras células germinativas (SCHULZ; MIURA, 2002).

Conforme há a incorporação e retenção de BrdU, este composto se dilui entre as células germinativas, devido à divisão celular das mesmas. No entanto, somente as células que apresentam um ciclo celular mais longo retêm a marcação até o último período em que o material biológico foi coletado, característica esta, de células-tronco ou, ainda, as células chamadas de “labeling-retaining cells” (LEAL et al., 2009; NÓBREGA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014, SCHULZ et al., 2010; SCHULZ; MIURA, 2002).

A fim de analisar as “labeling-retaining cells”, ou seja, as células germinativas que apresentaram marcação por maior período de tempo, as possíveis candidatas às espermatogônias-tronco, Nóbrega e colaboradores (2010), utilizando a técnica de incorporação e retenção de BrdU em *zebrafish* (*Danio rerio*), observaram que ambas as espermatogônias indiferenciadas Aund* e Aund retiveram o BrdU até o último dia de coleta (25 dias).

Concomitantemente à análise das possíveis candidatas às espermatogônias-tronco, ou seja, as “labeling-retaining cells”, este mesmo grupo analisou, a partir da técnica de incorporação e retenção de BrdU, a distribuição topográfica (ou nicho espermatogonial) das espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund) nos túbulos seminíferos de *zebrafish* (*Danio rerio*) e observaram que 75% destas células estão situadas adjacentes ao interstício, o mesmo observado em *A. altiparanae* no presente trabalho. Além disso, puderam observar que durante três sucessivas

exposições de BrdU com duração de 10 horas do mesmo por três dias consecutivos, as espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund) têm um longo ciclo celular, durando, pelo menos 10 horas, porém, menos de 30 horas. No entanto, a perda de BrdU variou entre os dois tipos de espermatogônias: as do tipo Aund se dividem mais rapidamente, sendo chamadas de células “ativas”, devido a sua rápida diferenciação e proliferação (como indicado pela perda mais rápida de BrdU), enquanto as do tipo Aund* apresentam um ciclo celular mais lento, sendo chamadas de células “reservas”, (devido ao índice de marcação estável e maior retenção do BrdU) (NÓBREGA et al., 2010), o mesmo observado em lambari (*A. altiparanae*), visto que houve diferença de marcação entre as espermatogônias indiferenciadas (Aund).

Mais recentemente, em carpa comum (*Cyprinus carpio*), Oliveira (2014), utilizou a mesma técnica de incorporação e retenção de BrdU para analisar as células que possuem um longo ciclo celular, ou seja, células quiescentes, características estas de células-tronco. Assim como observado em lambari (*A. altiparanae*) no presente estudo e em *zebrafish* (*Danio rerio*) (NÓBREGA et al., 2010), as espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund* e Aund retiveram BrdU até o último dia de coleta (21 dias). E, ainda, ao se comparar a cinética de perda de BrdU entre os dois tipos celulares, observaram que as espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund* são células mais quiescentes, pois retiveram o BrdU ao longo de todo o período avaliado, enquanto as espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund são células mais ativas, as quais tiveram o BrdU diluído rapidamente entre suas células-filhas.

No entanto, apesar de em lambari (*A. altiparanae*) as espermatogônias indiferenciadas (Aund) apresentarem marcação ao longo de todo o período avaliado, estas células ainda se encontravam fortemente marcadas até o último dia de coleta, 3 semanas após o último pulso de BrdU, ao contrário do observado em *zebrafish* (*Danio rerio*) e em carpa comum (*Cyprinus carpio*), onde foi visto marcação, porém, mais fraca (NÓBREGA et al., 2010; OLIVEIRA, 2014).

Além disto, embora não se possa reconhecer com certeza absoluta as diferenças entre a morfologia celular de cada tipo de espermatogônia indiferenciada (Aund* e Aund) durante a análise da incorporação e retenção de BrdU, em parte devido à espessura do corte, sugere-se que haja uma cinética diferente entre ambas, já que foi observada marcação mais forte em algumas espermatogônias

indiferenciadas, enquanto em outras, a marcação apresentou-se mais fraca ao BrdU. Assim, acredita-se que o ciclo celular das espermatogônias indiferenciadas (Aund) em lambari (*A. altiparanae*) seja mais longo, por isso a marcação ser mais forte até a última semana de coleta (3s), se comparado com o que já foi observado em *zebrafish* (*Danio rerio*) e em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (NÓBREGA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Uma possibilidade de confirmação desta hipótese seria postergar a coleta de dados por mais alguns dias, com o objetivo de verificar a progressiva perda da marcação do BrdU.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho concluiu-se que:

- A morfologia das espermatogônias indiferenciadas, as possíveis candidatas às espermatogônias-tronco em *A. altiparanae*, é conservada, visto que há similaridade com peixes de outras espécies até então estudadas como *zebrafish* (*Danio rerio*), tilápia (*Oreochromis niloticus*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e curimbatá (*Prochilodus lineatus*), e com mamíferos;
- Características morfológicas indicaram a presença de diferentes espermatogônias indiferenciadas em *A. altiparanae*: as espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund* e as espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund;
- O nicho espermatogonial de espermatogônias indiferenciadas Aund* e Aund em *A. altiparanae* é diferente para cada tipo celular visto que as do tipo Aund* têm localidade preferencial próxima ao interstício, enquanto as do tipo Aund têm localidade preferencial próxima ao intertúbulo, indicando diferentes interações destas células com os tecidos adjacentes e seus componentes;
- Com base na técnica de incorporação e retenção de BrdU, foi possível encontrar e analisar as possíveis candidatas às espermatogônias-tronco, devido à capacidade das mesmas em reter BrdU por um longo período de tempo, característica esta, de células quiescentes (células-tronco).

REFERÊNCIAS*

- AGOSTINHO, C. A.; MOLINARI, S. L.; AGOSTINHO, A. A.; VERANI, J. R. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L) (Osteichthyes-Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 31–16, 1984.
- BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. 336p.
- BARBIERI, G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J. M. Época de reprodução peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 7, p. 1057–1065, 1982.
- BATLOUNI, S. R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 116–132, 2006.
- BRAAT, A. K.; SPEKSNIJDER, J. E.; ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. **International Journal of Developmental Biology**, v. 43, p. 745–760, 1999.
- CAMPOS-JUNIOR, P. H.; COSTA, G. M.; LACERDA, S. M.; REZENDE-NETO, J. V.; PAULA, A. M.; HOFMANN, M. C.; FRANÇA, L. R. The spermatogonial stem cell niche in the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 155, p. 1–10, 2012.
- CEMIG/CETEC – COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG, 2000. 144 p.
- CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L. D. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. **Reproduction**, v. 123, p. 567–577, 2002.
- COSTA, F. G.; ADOLFI, M. C.; GOMES, C. C.; JESUS, L. W. O.; BATLOUNI, S. R.; BORELLA, M. I. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicystic spermatogenesis. **Micron**, v. 61, p. 20–27, 2014.
- COSTA, G. M. J.; AVELAR, G. F.; REZENDE-NETO, J. V.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; LACERDA, S. M. S. N.; ANDRADE, B. S. C.; THOMÉ, R. G.; HOFMANN, M. C.; FRANÇA, L. R. Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. **PLOS One**, v. 7, n. 8, p. 1–13, 2012.
- DE ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Jornal of Andrology**, v. 21, p. 776–798, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DE ROOIJ, D. G. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 21, p. 7939–7940, 2006b.

DE ROOIJ, D. G. The spermatogonial stem cell niche. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, p. 580–585, 2009.

DE ROOIJ, D. G.; GRISWOLD, M. D. Questions about spermatogonia and answered since 2000. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1085–1095, 2012.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 575 p.

FISHELSON L. Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid ciclid fish (Ciclidae, Teleostei). **Journal of Morphology**, v. 256, p. 285–300, 2003.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS Série Zoologia**, v. 13, p. 65–88, 2000.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. **The Sertoli cell**. Clearwater: Cache River Press, 1993. p. 703–739.

GRIER, H. J.; URIBE-ARANZABAL, M. C. The testis and spermatogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes)**. New Hampshire: Science Publishers, Endfield, 2009. p. 119–142.

HAYASHI, C.; MEURER, F.; BOSCOLO, W. R.; LACERDA, F.C.H.; KAVATA, L.C.B. Frequência de Arraçoamento para Alevinos de Lambari do Rabo-Amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.1, p. 21–26, 2004.

HAZIN, F. H. V. A pesca na zona econômica exclusiva, ZEE: sua importância para o Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 1, n. 1, p. 10–18, 2006.

HOFMANN, M. C. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 288, p. 95–103, 2008.

HONG, Y.; LIU, T.; ZHAO, H.; XU, H.; WANG, W.; LIU, R.; CHEN, T.; DENG, J.; GUI, J. Establishment of a normal medaka fish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8011–8016, 2004.

KNAUT, H.; PELEGRI, F.; BOHMANN, K.; SCHWARZ, H.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. **J. The Journal of Cell Biology**, v. 149, p. 875–888, 2000.

KOULISH, S.; KRAMER, C. R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v. 254, p. 292–311, 2002.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; COSTA, G. M. J.; SEGATELLI, T. M.; QUIRINO, B. R.; QUEIROZ, B. M.; KALAPOTHAKIS, E.; FRANÇA, L. R. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. **PLOS One**, v. 5, n. 5, p. 1–9, 2010.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, M. T. D.; RESENDE, R. R.; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and *in vitro* propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 1, n. 192, p. 95–106, 2013.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; FRANÇA, L. R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. **General and Comparative Endocrinology**, v. 207, p. 56–65, 2014.

LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and stereological evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 177–187, 2009.

MATTA, S. L. P.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. The goitrogen 6-npropyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the Tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 970–978, 2002.

MATTEI, X.; SIAU, Y.; THIAM, D. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp (Pisces Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. **Journal of Fish Biology**, v. 43, p. 931–937, 1993.

MELO-DIAS, G. C. **Caracterização, isolamento e cultura de espermatogônias primárias de Curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)**. 2015. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MIURA, T.; MIURA, C.; OHTA, T.; NADER, M. R.; TODO, T.; YAMAUCHI, K. Estradiol-17b stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 264, p. 230–234, 1999.

MOREIRA FILHO, O. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinis* (Jenyns, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. 1989. 135 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1989.

MOTTA, R. L.; UIDA, V. S. Hábito alimentar da comunidade de peixes de um ambiente lótico tropical (CUESTA de BOTUCATU). In: ENCONTRO BRASILEIRO

DE ICTIOLOGIA. 11., 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1995.

MOYLE, P. B.; CECH Jr, J. J. **Fishes**: an introduction to ichthyology. 3rd ed. 1996.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 197–206, 2009.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 197–206, 2009.

NÓBREGA, R. H.; CAAJ, C. D.; KANT, H. V.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R.W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLOS One**, v. 5, p. 1–16, 2010.

NÓBREGA, R. H.; MORAIS, R. D. V. S.; CRESPO, D.; WAAL, P. P.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W.; BOGERD, J. Fsh Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in Zebrafish via Igf3. **Endocrinology**, v. 156, p. 1–14, 2015.

OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. The germline stem cell niche unit in Mammalian testes. **Physiological Reviews**, v. 92, p. 577–595, 2012.

OLIVEIRA, M. A. **Nicho espermato gonial em *Cyprinus carpio* e papel do Amh na espermato gênese**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – CAUNESP, Jaboticabal, 2014.

PAIVA, S. R.; DERGAM, J. A.; MACHADO, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**, v. 560, p. 393–404, 2006.

PARENTI, L. R.; GRIER, H. J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v. 44, p. 333–348, 2004.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aqüicultura**, v. 11, n. 67, p. 15–19, 2001.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. 470 p.

QUAGIO-GRASSIOTTO I.; CARVALHO E. D. The ultrastructure of *Sorubim Lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. **Tissue Cell**, v. 31, n. 6, p. 561–567, 1999.

QUINTERO-HUNTER, T.; GRIER, H. J.; MUSCATO, M. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid/ Schiffshematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 66, p. 169–172, 1991.

SANTOS, R. A. Dinâmica da nutrição do tambuí *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Pisces, Characiformes, Characidae) na represa de Ibatinga, SP., Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 115–124, 1995.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 267–273, 2006.

SIQUEIRA-SILVA, D. H. **Transplante xenogênico de espermatogônias tronco de *Brycon orbignyanus* em *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae)**. 2015. 116 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYE, J. J.; LE GAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NÓBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 390–411, 2010.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 43–56, 2002.

SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H.; MORAIS, R. D. V. S.; DE WAAL, P. P.; FRANÇA, L. R.; BOGERD, J. Endocrine and paracrine regulation of zebrafish spermatogenesis: the Sertoli cell perspective. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 81–87, 2015.

SUAREZ, Y. R.; SOUZA, R.; PEREIRA, R. A. C. Ecologia alimentar de *Astyanax bimaculatus* (CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE), no canal do Tamengo Corumbá, MS. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 11., 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1995.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.

VITULE, J. R. S.; ARANHA, J. M. R. Ecologia alimentar do lambari, *Deuterodon langei* Travassos, 1957 (Characidae, Tetragonopterinae), de diferentes tamanhos em um riacho da Floresta Atlântica, Paraná (Brasil). **Acta Biologia Paranaense**, v. 31, p. 137–150, 2002.

YOSHIDA, S.; SUKENO, M.; NABESHIMA, Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. **Science**, v. 317, p. 1722–1726, 2007.

ZHANG, Z.; SHAO, S.; MEISTRICH, M.L. The radiation-induction block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. **Journal Cell Physiology**, v. 211, n. 1, p. 149–158, 2007.