

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Tese será disponibilizado somente
a partir de 03/06/2027.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROTEÔMICA DA MATRIZ
EXTRACELULAR TESTICULAR DESCELULARIZADA DE *Astyanax*
lacustris E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE CULTIVO 3D DE
CÉLULAS GERMINATIVAS PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

IVANA FELIPE DA ROSA

PROF. DR. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

**BOTUCATU – SP
2025**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROTEÔMICA DA MATRIZ
EXTRACELULAR TESTICULAR DESCELULARIZADA DE *Astyanax*
lacustris E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE CULTIVO 3D DE
CÉLULAS GERMINATIVAS PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

IVANA FELIPE DA ROSA

PROF. DR. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

Tese apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega

**BOTUCATU – SP
2025**

R788c Rosa, Ivana Felipe da
Caracterização estrutural e proteômica da matriz extracelular testicular
descelularizada de *Astyanax lacustris* e desenvolvimento de sistema de
cultivo 3D de células germinativas para aplicações biotecnológicas / Ivana
Felipe da Rosa. -- Botucatu, 2025
157 p.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Biotecnologia, Botucatu
Orientador: Rafael Henrique Nóbrega
Coorientador: Changwei Shao
1. Scaffolds Testiculares. 2. Descelularização. 3. Matriz Extracelular. 4.
Organoides. 5. *Astyanax lacustris*. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Impacto Científico: O presente estudo traz contribuições científicas relevantes ao propor um método para obtenção de matriz extracelular testicular descelularizada (dtECM) de peixe. A matriz obtida apresenta potencial para ser utilizada em culturas 3D de espermatogônias tronco de peixes em condições *in vitro*, além de servir como base para bioimpressão testicular. Além disso, os esferoides testiculares 3D desenvolvidos em *Astyanax lacustris* representam uma alternativa aos métodos convencionais de cultura celular e um modelo promissor para pesquisas em reprodução animal, permitindo avanços no conhecimento da espermatogênese, avaliação da fertilidade e estudos de toxicologia reprodutiva.

Impacto social e econômico: Os protocolos desenvolvidos neste estudo podem ser aperfeiçoados para permitir a formação de esferoides/organoides testiculares funcionais, capazes de reproduzir a espermatogênese *in vitro*. Esses avanços podem ter aplicações promissoras em estudos de toxicidade reprodutiva, permitindo o monitoramento de efeitos de poluentes aquáticos sobre a fertilidade de peixes, assim como na aquicultura e na conservação ambiental, possibilitando a produção de espermatozoides *in vitro* de espécies que apresentam maturação reprodutiva tardia e de espécies ameaçadas de extinção. Como resultado, a produção de espermatozoides *in vitro* de espécies de interesse econômico também pode contribuir para a intensificação da produção aquícola, aumentando a oferta de pescado e tornando-o mais acessível.

Potential impact of this research

Scientific Impact: This study provides significant scientific contributions by developing a novel method for obtaining decellularized testicular extracellular matrix (dtECM) from fish, with potential applications for *in vitro* culture of male germ cells. The obtained matrix shows promise for use in 3D cultures as a scaffold to support the proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in fish under *in vitro* conditions, while also serving as a foundation for testicular bioprinting. Furthermore, the 3D testicular spheroids developed in *Astyanax lacustris* represent an alternative to conventional cell culture methods and a promising model for animal reproduction research, enabling advances in understanding spermatogenesis, fertility assessment, and reproductive toxicology studies.

Social and Economic Impact: The protocols developed in this study may be refined to generate functional testicular spheroids/organoids capable of reproducing spermatogenesis *in vitro*. These

advances could lead to promising applications in reproductive toxicity studies, allowing monitoring of aquatic pollutants' effects on fish fertility, as well as in aquaculture and environmental conservation by enabling *in vitro* sperm production in late-maturing and endangered species. As a result, *in vitro* sperm production of economically valuable species could enhance aquaculture productivity, increasing fish supply and making it more accessible to different segments of society.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE IVANA FELIPE DA ROSA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 03 dias do mês de junho do ano de 2025, às 8h30min, no(a) Sala da Pós-Graduação da Central de Aulas, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de IVANA FELIPE DA ROSA, intitulada **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROTEÔMICA DA MATRIZ EXTRACELULAR TESTICULAR DESCELULARIZADA DE *Astyanax lacustris* E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE CULTIVO 3D DE CÉLULAS GERMINATIVAS PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Dra. FABIANA FERREIRA DE SOUZA (Participação Virtual) do(a) Departamento De Cirurgia Veterinária E Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ - UNESP, Profa. Dra. FLAVIA KARINA DELELLA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Dra. JANAINA DE ANDRÉA DERNOWSEK (Participação Virtual) do(a) Empresa Quantis, BioEdTech, USP, Dr. ARNO JULIANO BUTZGE (Participação Virtual) do(a) Centro de Aquicultura (CAUNESP) / Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Jaboticabal. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Documento assinado digitalmente

RAFAEL HENRIQUE NOBREGA

Data: 03/06/2025 14:46:04-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

Dedicatória

Aos meus amados pais, Maria Isabel e Ivo, e minha vó, Benedicta, *in memoriam*, que com muito amor e sacrifícios me incentivaram e me apoiaram a sempre estudar. Obrigada por estarem comigo e não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã, Stephanie, por sempre me motivar a seguir em frente e a não desistir dos meus ideais. Obrigada por estar presente ativamente em minha vida.

Ao meu amado esposo, Lucas, por ser meu par na jornada da vida e meu parceiro na carreira científica. Obrigada por me encorajar a não desistir e acreditar no meu potencial como ser humano, mulher e profissional. Sou imensamente grata por poder compartilhar essa jornada com você e por ter te escolhido como meu coautor na vida.

À família que ganhei pelo amor, meus sogros Cleuza Cristina e Fernando, e minhas cunhadas, Victória e Giovanna: obrigada por me receberem com tanto carinho e por transformarem essa etapa em uma jornada ainda mais leve, acolhedora e bonita.

À Kethelyn, Amanda, Jéssica, Luiz, Ana e Lurdes, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e por tornarem essa jornada mais leve e especial. Obrigada por estarem presentes em cada etapa!

Por fim, aos meus amigos que viraram família, aos professores que me inspiraram, aos colegas que compartilharam risadas e desafios - cada um de vocês deixou marcas nesta trajetória.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de qualquer forma contribuíram para realização desta tese.

Em especial, ao Professor Dr. Rafael Henrique Nóbrega, pela competente orientação em todas as etapas envolvidas neste trabalho. A concretização desta tese deve-se muito, à sua dedicação, e paixão à pesquisa. Muito obrigada por todo incentivo e por acompanhar minha evolução científica ao longo destes anos.

Ao Professor Dr. Shangwei Shao (Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, China), minha sincera gratidão por acolher-me em seu laboratório e por todo o apoio científico oferecido. Agradeço também aos meus colegas e amigos Yu Ban, Li Shuo, Kaiqiang Liu, Su Chengcheng, Yue Wang, Hong-Yan Wang e Qian Wang, pelo companheirismo e pelas contribuições científicas compartilhadas durante este período.

À secretária Luciana e aos técnicos José Eduardo, Helton, Keila e Ricardo do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biotecnologia de Botucatu/Unesp pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Meus sinceros agradecimentos à banca avaliadora, Profa. Fabiana Ferreira de Souza, Profa. Dra. Flávia Karina Delella, Profa. Dra. Janaina de Andrea Dernowsek, Prof. Dr. Arno Juliano Butzge, Profa. Maeli Dal Pai e Profa. Hemily Batista da Silva, pelas valiosas contribuições, observações e sugestões que enriqueceram significativamente este trabalho.

Aos meus amigos e a todos os integrantes do Laboratório Reproductive and Molecular Biology Group (RMBG), IBB, UNESP-Botucatu: Amandas, Anabel, Aldo, Arno, Beatriz, Daniel, Juliana, Lucas, Maira, Marcos, Matheus, Melanie e José. Obrigada por todo o suporte, amizade, momentos e cafés compartilhados.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, IBB, UNESP, Botucatu e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela formação profissional.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão dos projetos desenvolvidos no Brasil (2018/10265-5 e 2020/15237-0) e no Exterior (processo 2023/02050-7 BEPE).

**“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”
(Antoine de Saint-Exupéry)**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



**“Porque eu sou do tamanho do que vejo, e não do tamanho da minha altura. E o que vejo
são os meus sonhos”
(Fernando Pessoa)**

Resumo Geral

O primeiro capítulo desta tese teve como objetivo desenvolver um protocolo de descelularização da matriz extracelular testicular (dtECM) derivada de peixe, utilizando *Astyanax lacustris* como modelo, por meio da combinação do detergente iônico dodecil sulfato de sódio (0,1% SDS) com métodos de agitação física. A remoção celular foi confirmada por análises histológicas e coloração com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), enquanto a preservação da matriz extracelular (ECM) foi avaliada por imunofluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e proteômica. O SDS foi eficaz na remoção das células, mantendo proteínas-chave da ECM, como Colágeno I, Fibronectina e Laminina $\alpha 1$. A microarquitetura testicular, incluindo a membrana basal e os túbulos seminíferos, permaneceu preservada. A proteômica revelou o enriquecimento de proteínas associadas à ECM e a depleção de proteínas relacionadas ao metabolismo celular. A dtECM manteve componentes essenciais do matrisoma, como diversos tipos de colágeno, fibronectina, laminina, heparam sulfato, integrinas, fatores secretados e reguladores da ECM. Esses achados indicam que a dtECM é um scaffold promissor para aplicações de cultura *in vitro*. Desta forma, estudos futuros são necessários para avaliar sua eficácia no suporte à proliferação e diferenciação das células germinativas de peixes *in vitro*, assim como, para padronizar a produção de hidrogéis derivados de dtECM. O segundo objetivo desta tese foi estabelecer protocolos para o desenvolvimento de esferoides testiculares 3D em *A. lacustris* utilizando um sistema de agregação celular forçada por centrifugação em micropoços. Os resultados demonstraram que as células germinativas se agregaram espontaneamente, formando estruturas esferoidais, arredondadas e/ou irregulares, com diferentes diâmetros. No entanto, observou-se a completa desintegração dos esferoides após sete dias de cultivo. Para superar essas limitações, estudos futuros devem combinar a técnica de agregação forçada com um sistema de cultivo em interface ar-líquido, a fim de melhorar o suprimento de nutrientes e a troca gasosa, além de testar formulações de meio de cultura otimizadas para melhorar a estabilidade dos esferoides a longo prazo e apoiar o desenvolvimento de organoides testiculares. Essa abordagem poderá viabilizar aplicações biotecnológicas, como a produção *in vitro* de espermatozoides para espécies de peixes de interesse econômico, especialmente aquelas com ciclos prolongados de maturação sexual.

Abstract

The first chapter of this thesis aimed to develop a decellularization protocol for testicular extracellular matrix (dtECM) derived from fish, using *Astyanax lacustris* as a model, through the combination of the ionic detergent sodium dodecyl sulfate (0.1% SDS) with physical agitation methods. Cellular removal was confirmed by histological analyses and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, while preservation of the extracellular matrix (ECM) was evaluated by immunofluorescence, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and proteomics. SDS effectively removed the cells while preserving key ECM proteins such as Collagen I, Fibronectin, and Laminin $\alpha 1$. The testicular microarchitecture, including the basement membrane and seminiferous tubules, remained preserved. Proteomic analysis revealed enrichment of ECM-associated proteins and depletion of proteins related to cellular metabolism. The dtECM retained essential matrisome components, including various types of collagen, fibronectin, laminin, heparan sulfate, integrins, secreted factors, and ECM regulators. These findings indicate that dtECM is a promising scaffold for *in vitro* culture applications. Therefore, future studies are needed to evaluate its effectiveness in supporting the proliferation and differentiation of germ cells from fish *in vitro*, as well as to standardize the production of hydrogels derived from dtECM. The second objective of this thesis was to establish protocols for the development of 3D testicular spheroids in *A. lacustris* using a forced cell aggregation system by centrifugation in microwells. The results showed that germ cells spontaneously aggregated, forming spheroidal, rounded, and/or irregular structures with varying diameters. However, complete disintegration of the spheroids was observed after seven days of culture. To overcome these limitations, future studies should combine the forced aggregation technique with an air-liquid interface culture system to improve nutrient supply and gas exchange, as well as test optimized culture medium formulations to enhance long-term spheroid stability and support testicular organoid development. This approach could enable biotechnological applications such as the *in vitro* production of spermatozoa for fish species of economic interest, especially those with prolonged sexual maturation cycles.

Lista de Abreviações

2D – Two-dimensional

3D – Three-dimensional

Adiff – Differentiating type A spermatogonia

AMRT – Accurate Mass Retention Time

Aund – Undifferentiated type A spermatogonia

BL – Basal Lamina

BMPs – Bone Morphogenetic Proteins

BSA – Bovine Serum Albumin

BV – Blood Vessel

bFGF – basic Fibroblast Growth Factor

Ccbe1 – Collagen and Calcium Binding EGF domains 1

Cmk1r2 – Chemokine-like receptor 2

CO₂ – Carbon Dioxide

Col – Collagen

CV – Coefficient of Variation

D/M I – Diplotene/Metaphase I

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

dECM – Decellularized Extracellular Matrix

DNA – Deoxyribonucleic Acid

DNase I – Deoxyribonuclease type I

dtECM – Decellularized Testicular Extracellular Matrix

DMEM/F-12 Ham – Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham

DTT – Dithiothreitol

E1/E2/E3 – Early/intermediate/late spermatids

ECM – Extracellular Matrix

EE – Embryo Extract

EGF – Epidermal Growth Factor

FAM20B – Family With Sequence Similarity 20 Member B

Fam20b – Family with sequence similarity 20 member B

FBS – Fetal Bovine Serum

FDR – False Discovery Rate

FGF – Fibroblast Growth Factor

FGF1 – Fibroblast Growth Factor 1

FGF2 – Fibroblast Growth Factor 2

FS – Fish Serum

GAGs – Glycosaminoglycans

GDNF – Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor

GO – Gene Ontology

hESC – human Embryonic Stem Cells

HE – Hematoxylin and Eosin

HDMS – High Definition Mass Spectrometry

Hi-N – High-N peptide quantification method

IAA – Iodoacetamide

in vitro – Outside a living organism

in vivo – Within a living organism

Itga5 – Integrin alpha 5

Itgb – Integrin beta

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

L-15 – Leibovitz medium

L/Z – Leptotene/Zygotene

LC-MS/MS – Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LE – Leydig cells

LIF – Leukemia Inhibitory Factor

MEV – Scanning Electron Microscopy

MEC – Extracellular Matrix

MET – Transmission Electron Microscopy

MSE – Data-Independent Acquisition

MT – Masson's Trichrome

mESM2 – Modified Embryonic Stem cell Medium 2

MY – Peritubular Myoid Cells

NDST2a – N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 2a

Ndst2a – N-deacetylase/N-sulfotransferase 2a

NEAA – Non-Essential Amino Acids

P – Pachytene

PBS – Phosphate-Buffered Saline
PDGF – Platelet-Derived Growth Factor
PLGS – ProteinLynx Global Server
PMSF – Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PPI – Protein-Protein Interaction
PRP – Platelet-Rich Plasma
PTMCs – Peritubular Myoid Cells
RT – Room Temperature
SC – Spermatoocyte
SDS – Sodium Dodecyl Sulfate
SE – Sertoli cells
SG – Spermatogonia
S/M II – Secondary spermatocytes/Metaphase II
SSCs – Spermatogonial Stem Cells
SZ – Spermatozoa
TFA – Trifluoroacetic Acid
TGF- β – Transforming Growth Factor Beta
TIC – Total Ion Current
Tnc – Tenascin
TOs – Testicular Organoids
ULA – Ultra-Low Attachment
ULAs – Ultra-Low Attachment plates
UPLC – Ultra-Performance Liquid Chromatography
UI – International Units
VEGFC – Vascular Endothelial Growth Factor C
VEGFs – Vascular Endothelial Growth Factors
Wnts – Wingless-Related Integration Site Proteins
ZVAD – caspase inhibitor

Sumário

1. Introdução Geral.....	16
1.1 Espermato gênese em peixes e dinâmica da matriz extracelular.....	16
1.2 Organoide testicular 3D como ferramenta para estudo da espermato gênese	21
1.3 Hidrogéis Naturais: Matriz extracelular descelularizada (dECM) e suas aplicações.....	23
2. Objetivo geral:.....	27
2.1 Objetivos específicos:.....	28
3. Referências Gerais	28
4. CAPÍTULO I.....	41
1. Introduction.....	43
2. Materials and Methods	44
3.Results	48
4. Discussion	54
5. Conclusion	57
6. References	76
5. CAPÍTULO II	76
<i>Desenvolvimento de sistema de cultivo 3D de células germinativas de <i>Astyanax lacustris</i>.....</i>	86
1. Introdução	87
2.Material e Métodos	88
3.Resultados	92
4.Discussão	95
5.Conclusão	97
6.Referências	97
6. CONCLUSÃO GERAL.....	101
7. Apêndices.....	102
Apêndice 1.....	102
Apêndice 2.....	102
Apêndice 3.....	104
Chromosomal-level genome assembly and annotation of red-bellied pacu (<i>Piaractus brachypomus</i>)	104
Apêndice 4.....	126
Comparison of differentially expressed profiles of coding and non-coding RNAs with associated ceRNA networks in the gonads of red-bellied pacu (<i>Piaractus brachypomus</i>)	126

1. Introdução Geral

1.1 Espermatogênese em peixes e dinâmica da matriz extracelular

A espermatogênese, é um processo biológico altamente regulado iniciado pelas células tronco espermatogoniais, que podem se autorrenovar ou se diferenciar para produzir espermatozoides (Grier et al., 1980; Hess & França, 2008; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010).

Em peixes, a espermatogênese ocorre no interior de estruturas denominadas espermatocistos ou cistos, sendo, por isso, caracterizada como espermatogênese cística (Grier, 1993; Pudney, 1993; 1995; Schulz et al., 2010; Siqueira-Silva et al., 2012) (Figura 1). Esses cistos se formam quando uma espermatogônia tronco é completamente envolta pelos prolongamentos das células de Sertoli. Assim, as células Sertoli suportam um único tipo de célula germinativa por vez ao longo de todo o processo (Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010). Essa organização única reflete adaptações evolutivas específicas à fisiologia reprodutiva dos teleósteos, com implicações diretas na regulação da espermatogênese e no microambiente espermatogonial (Schulz et al., 2010).

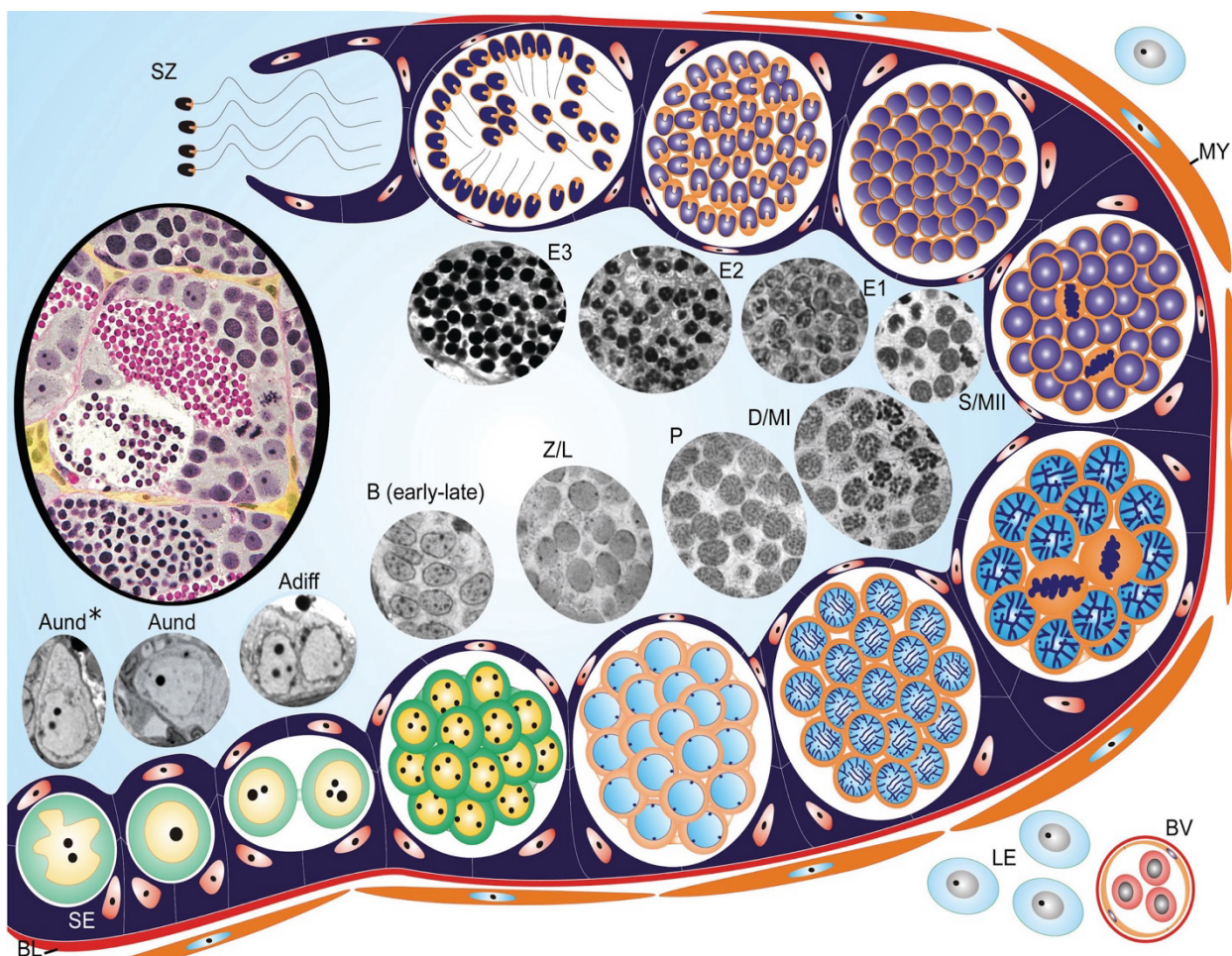


Figura 1. Espermatogênese cística em peixes. A imagem ilustra cistos contendo espermatogônias tronco completamente envoltas por prolongamentos das células de Sertoli, e túbulos seminíferos circundados por membrana basal, camada de células peritubulares e pelo compartimento intersticial. SE: células de Sertoli; BL: lâmina basal; MY: células peritubulares mióides, LE: células de Leydig, SG: espermatogônia; SC: espermatócito; Aund*: espermatogônia do tipo A indiferenciada*; Aund: espermatogônia do tipo A indiferenciada; Adiff: espermatogônia do tipo A diferenciada; B early-late: espermatogônia do tipo B; L/Z: espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno P: paquíteno; D/MI: diplóteno/metáfase I S/MII: espermatócitos secundários/metáfase II E1: espermátides iniciais; E2: intermediárias e E3: finais; SZ: espermatozóides e BV: vaso sanguíneo. Retirado de Schulz e colaboradores (2010).

Adicionalmente, estas estruturas tubulares são envoltas por uma membrana basal e camada de células peritubulares (Bellve e Zheng, 1989; Nóbrega et al., 2009; Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010). O compartimento intersticial constitui de um tecido conjuntivo formado por fibroblastos, células produtoras de hormônios sexuais esteroides (células de Leydig) e vasos sanguíneos (de Rooij, 2009). Os hormônios sexuais atuam como reguladores críticos do processo espermatogênico, promovendo a diferenciação celular, sustentando a progressão das células germinativas e mantendo a homeostase testicular através de mecanismos parácrinos (Hedger & Kretser, 2000; Ge et al., 2009; Zirkin & Papadopoulos, 2018; de Castro Assis et al., 2018; Nóbrega & Lareyre, 2024).

Paralelamente, a matriz extracelular (MEC), constituinte da membrana basal e do espaço intersticial, é composta por elementos estruturais, fatores de crescimento e citocinas que atuam simultaneamente para fornecer suporte estrutural, fonte de sinais bioativos e interface dinâmica para interações célula-matriz, modulando assim diversos aspectos da espermatogênese. A integração entre os componentes celulares e matriciais cria um nicho altamente regulado que orquestra o desenvolvimento das células germinativas por meio de interações mecânicas e bioquímicas (Mouw et al., 2014; Häcker et al., 2005; Schaefer, 2010; Padhi & Nain, 2020; Siu & Cheng, 2004; Cheng et al., 2010; Li et al., 2021; Tosti et al., 2016; Bu et al., 2022).

Em maiores detalhes, a MEC é uma estrutura tridimensional composta por proteínas fibrosas, polissacarídeos e proteoglicanos, que fornece suporte natural às células (Figura 2) (Agmon e Christman, 2016). Além de promover o contato célula-célula, a MEC facilita a adesão e migração celular e regula a distribuição e ação dos fatores de crescimento (Kleinman et al., 1986; Oğuzkurt et al., 2007; Santana e Quagio-Grassiotto, 2014; Baert et al., 2015; Poole and Mostaço-Guidolin, 2021; Hammond et al., 2011). Seus principais componentes incluem as proteínas fibrosas como colágeno e elastina, que conferem resistência mecânica, glicoproteínas adesivas

como, laminina e fibronectina, fundamentais para a adesão celular e os proteoglicanos, que são responsáveis por formar géis hidrofílicos que auxiliam na sinalização celular (Hohenester and Engel, 2002; Swinehart and Badylak, 2016; Poole and Mostaço-Guidolin, 2021).

Outros elementos, como as integrinas, metaloproteases, citocinas e fatores de crescimento, também interagem com a MEC e desempenham um papel importante na manutenção da homeostase celular (Siu et al., 2003; Bosman and Stamenkovic, 2003; Schwarzbauer e DeSimone, 2011; Kim et al., 2011; Karamanos et al., 2021). As integrinas por exemplo, são receptores celulares capazes de mediar a comunicação entre o citoesqueleto e as proteínas da MEC, enquanto as metaloproteases atuam no remodelamento da matriz (Kim et al., 2011; Karamanos et al., 2021; Stamenkovic, 2003). Os fatores de crescimento, por sua vez, como o fibroblast growth factor básico (bFGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factors (VEGFs), transforming growth factor beta (TGF- β), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), Wingless-related integration site proteins (Wnts), bone morphogenetic proteins (BMPs) e fibroblast growth factors (FGFs), desempenham papéis essenciais para regular a adesão, proliferação e diferenciação celular (Bellve e Zheng, 1989; Burgess, 1989; Siu and Cheng, 2004; Baciani et al., 2010; Hynes e Naba, 2012; Kim et al., 2011). Além disso, proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina e glicosaminoglicanos (GAGs), especialmente os sulfatos de heparan, têm a capacidade de se ligar especificamente a uma variedade de fatores de crescimento, como VEGF, EGFs e platelet-derived growth factor (PDGF) (Hynes e Naba, 2012; Wijelath et al., 2006; Lin et al., 2010; Ishihara et al., 2018). Nesse sentido, essas interações são fundamentais para a sinalização celular e a manutenção do microambiente tecidual.

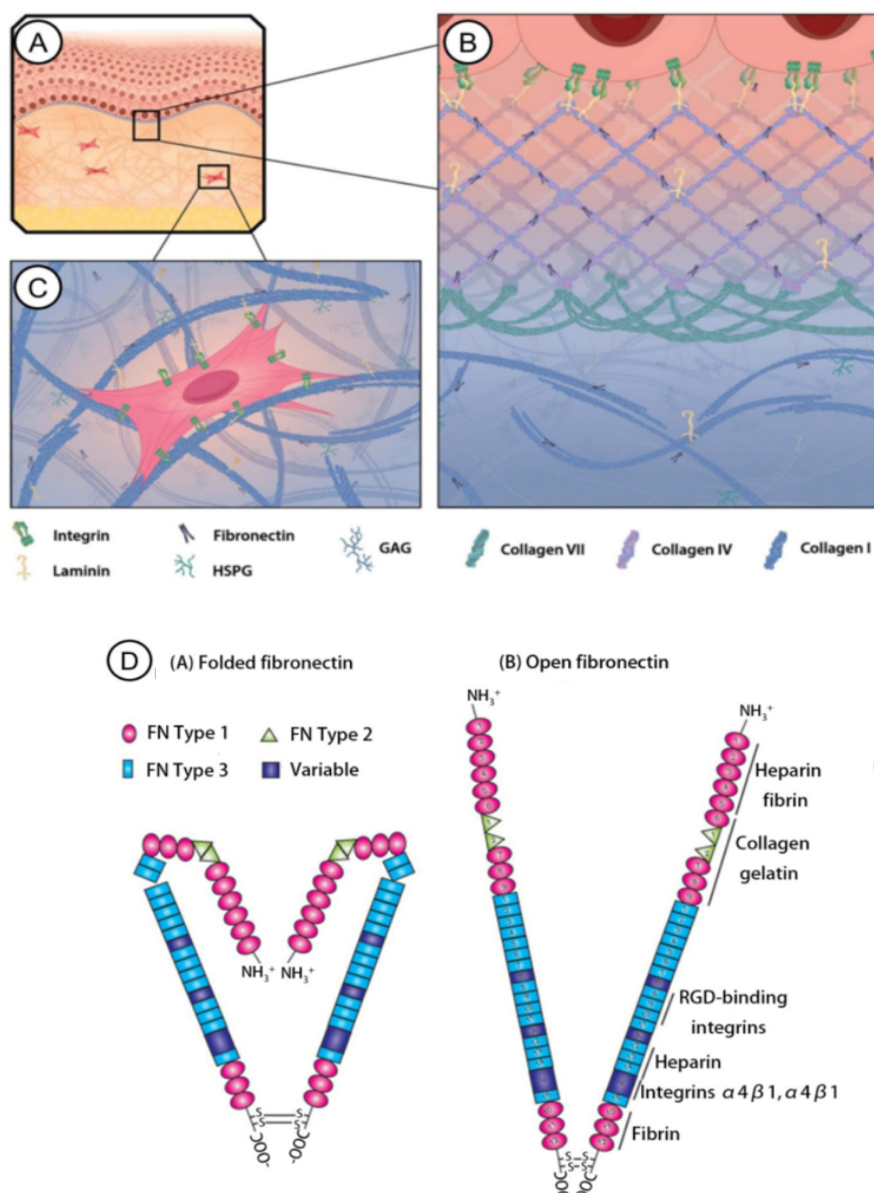


Figura 2. Estruturas nano e subnanométricas da pele de mamíferos como modelos exemplares de interação célula-MEC e alguns dos principais componentes da MEC. (A) Estrutura da pele de mamíferos. (B) O colágeno tipo IV é o principal componente estrutural da lâmina basal da pele. Ele forma uma rede junto com a fibronectina e a laminina. (C) A derme é composta por colágeno tipo I e substância fundamental (glicoproteínas multiadesivas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos), que formam uma estrutura fibrilar tridimensional para a adesão celular. (D) Fibronectina nas conformações aberta e dobrada. Retirado de Pfisterer et al., 2021; Drain et al., 2020; Ni et al., 2014; Zhao et al., 2023.

Mais especificamente, nos testículos, os componentes da MEC, como fibronectina e laminina, são produzidos pelas células peritubulares mióides e células de Sertoli, respectivamente, enquanto proteoglicanos e colágenos tipo I e IV são secretados por ambas (Tung et al., 1984a;

Tung et al., 1984b; Rossi et al., 2002; De Castro Assis, 2011; Skinner et al., 1985; Santana e Quagio-Grassiotto, 2014). A fibronectina facilita a adesão das células de Sertoli à membrana basal, e o colágeno IV é essencial para a formação dos cordões testiculares em camundongos (Van e Hofman, 1999). Além disso, o colágeno e a laminina regulam as junções entre as células de Sertoli, permitindo a migração das células germinativas da lâmina basal para o lúmen dos túbulos seminíferos de roedores (Hadley et al., 1990; Chui et al., 2011). Adicionalmente, as espermatogônias tronco (SSCs), localizadas nos túbulos seminíferos, possuem uma regulação complexa envolvendo sinais endócrinos, autócrinos e parácrinos, além de interações celulares, que garantem sua proliferação, sobrevivência e diferenciação (Nóbrega et al., 2009; Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010; Nóbrega & Lareyre, 2024). Desta maneira, essas células também dependem de fatores de crescimento, como o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), secretado pelas células de Sertoli, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e do fator de crescimento epidérmico (EGF), os quais são caracterizados por serem componentes intrínsecos da MEC (Bellve and Zheng, 1989; Hofmann, 2008; Abé et al., 2008; Murdock et al., 2019; Doretto et al., 2022).

Adicionalmente, ao longo do ciclo reprodutivo em peixes, a MEC sofre um intenso remodelamento, assegurando a organização e interação adequada das células testiculares (Santana et al., 2014; Lopes et al., 2004). Essa plasticidade evidencia a função da MEC não apenas como arcabouço estrutural, mas também como mediadora crítica de processos como adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Li et al., 2020; Lin et al., 2021; Mouw et al., 2014). Neste contexto, dada a relevância da espermatogênese, é essencial investigar os fatores que regulam a manutenção das espermatogônias tronco e sua atividade nos testículos.

Embora os cultivos celulares em monocamada (2D) tenham sido ferramentas valiosas para estudos celulares nas últimas décadas (Choi et al., 2010; Duval et al., 2010; Kolind et al., 2012), sua capacidade de reproduzir fielmente o microambiente fisiológico é limitada. Esses sistemas simplificados não conseguem recapitular a arquitetura tridimensional, as interações célula-matriz e os gradientes de sinalização presentes nos tecidos nativos, fatores cruciais para o comportamento celular adequado. Estudos demonstram que essa falta de complexidade compromete especialmente a proliferação e diferenciação de células germinativas *in vitro* (Figallo et al., 2007; Caron et al., 2012; Ihalainen et al., 2015; Wang et al., 2010), evidenciando a necessidade da aplicação de outros modelos de cultura que apresentem uma maior complexidade estrutural e bioquímica. Nesse contexto, sistemas de cultura tridimensionais (3D) surgem como alternativas promissoras para reproduzir com maior fidelidade os aspectos do microambiente testicular, favorecendo estudos

Funding

This research was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (23/02050-7 granted to IFR; 21/06742-5 granted to RHN).

Data Availability Statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

Ethics Statement

All the experiments were conducted following the Ethics Committee on Animals Experiments of of Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI), Chinese Academy of Fishery Sciences (CAFS) (Approval N°YSFRI-2024).

Conflicts of Interest

The authors declare no competing interest.

Reference

- Atique, Usman, and Kwang-Guk An. "Potential risky exotic fish species, their ecological impacts and potential reasons for invasion in Korean aquatic ecosystems." *Journal of Ecology and Environment* 46 (2022).
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bizuayehu, T. T., & Babiak, I. (2014). MicroRNA in teleost fish. *Genome Biology and Evolution*, 6(8), 1911-1937.
- Cavalcanti, L. D., Lima, L. D., Carrijo-Mauad, J. R., Russo, M. R., de Oliveira, A. V., & Takemoto, R. M. (2024). Evaluating the Presence of Interspecific Hybrids Among *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus* and *Colossoma macropomum* in the Upper Paraná River Using Genetic Markers. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 34(10), e4262.
- Cech, T. R., & Steitz, J. A. (2014). The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 157(1), 77-94.

- Chen, H., Li, S., Xie, Z., Zhang, Y., Zhu, C., Deng, S., ... & Huang, H. (2016). The complete mitochondrial genome of the *Piaractus brachypomus* (Characiformes: Characidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(2), 1289-1290.
- Chen, L. L., & Kim, V. N. (2024). Small and long non-coding RNAs: Past, present, and future. *Cell*, 187(23), 6451-6485.
- Chen, Y., Chen, Y., Shi, C., Huang, Z., Zhang, Y., Li, S., ... & Chen, Q. (2018). SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *Gigascience*, 7(1), gix120.
- Cheng, J., Yang, F., Liu, S., Zhao, H., Lu, W., & Zhang, Q. (2022). Transcriptomic analysis reveals functional interaction of mRNA-lncRNA-miRNA in steroidogenesis and spermatogenesis of gynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biology*, 11(2), 213.
- Daehwan, K., Paggi Joseph, M., Chanhee, P., Christopher, B., & Salzberg Steven, L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907-915.
- Deng, Q., Zhao, N., Zhu, C., & Zhang, B. (2022). Long non-coding RNAs in the physiology of aquaculture animals: a perspective update. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 32(4), 1103-1122.
- Dong, Y., Lyu, L., Zhang, D., Li, J., Wen, H., & Shi, B. (2021). Integrated lncRNA and mRNA transcriptome analyses in the ovary of *Cynoglossus semilaevis* reveal genes and pathways potentially involved in reproduction. *Frontiers in Genetics*, 12, 671729.
- Elias, Diego J., et al. "First record of the non-native pacu, *Piaractus brachypomus*, in Lago Petén-Itzá, Guatemala, Central America." *Occasional Papers of the Museum of Natural Science, Louisiana State University* 1.88 (2018): 1.
- Escobar L, M. D., Andrade-López, J., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2015). Delimiting evolutionarily significant units of the fish, *Piaractus brachypomus* (Characiformes: Serrasalminae), from the Orinoco and Amazon river basins with insight on routes of historical connectivity. *Journal of Heredity*, 106(S1), 428-438.
- Escobar L, M. D., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2022). Genetic comparison of populations of *Piaractus brachypomus* and *P. orinoquensis* (Characiformes: Serrasalminae) of the Amazon and Orinoco basins. *Neotropical Ichthyology*, 20, e220056.
- Escobar L, M. D., Ota, R. P., Machado-Allison, A., Andrade-López, J., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2019). A new species of *Piaractus* (Characiformes: Serrasalminae) from the Orinoco

- Basin with a redescription of *Piaractus brachypomus*. *Journal of Fish Biology*, 95(2), 411-427.
- FAO 2024. *Piaractus brachypomus*. In: *Fisheries and Aquaculture*. Rome. [Cited Thursday, May 23rd 2024]. <https://www.fao.org/fishery/en/introsp/431/en>
- Felipe Rojas-Cruz, A., Ciceri-Coronado, C., & Reyes-Bermúdez, A. (2023). Mitochondrial genotyping of cultured *Piaractus brachypomus* revealed low diversity and mutations in regions involved in metabolisms and proliferation. *Aquaculture & Fisheries* (2096-1758), 8(3).
- Gay, S., Thermes, V., Couve, S., & Bobe, J. (2020). Identification and characterization of small non-coding RNAs expressed in the ovary and potentially involved in oogenesis in medaka.
- Gong, Z., Shi, R., Chen, S., & Wang, N. (2022). CircRNA Identification and CircRNA-miRNA-mRNA Network in *Cynoglossus semilaevis* Sexual Size Dimorphism. *Biology*, 11(10), 1451.
- Guo LL, Song CH, Wang P, Dai LP, Zhang JY, Wang KJ. Competing endogenous RNA networks and gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(41):11680-7.
- Guttman, M., & Rinn, J. L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 482(7385), 339-346.
- He, Z., Ye, L., Yang, D., Ma, Z., Deng, F., He, Z., ... & Yan, T. (2022). Identification, characterization and functional analysis of gonadal long noncoding RNAs in a protogynous hermaphroditic teleost fish, the ricefield eel (*Monopterus albus*). *BMC Genomics*, 23(1), 450.
- Hou, M., Wang, Q., Zhang, J., Zhao, R., Cao, Y., Yu, S., ... & Li, J. (2023). Differential expression of miRNAs, lncRNAs, and circRNAs between ovaries and testes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Cells*, 12(22), 2631.
- Huang, T., Gu, W., Liu, E., Shi, X., Wang, B., Wu, W., ... & Xu, G. (2021). Comprehensive analysis of miRNA-mRNA/lncRNA during gonadal development of triploid female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genomics*, 113(6), 3533-3543.
- Jiang, B., Lu, S., Li, Y., Badran, M. F., Dong, Y., Xu, P., ... & Tao, Y. (2024). Integrative analysis of miRNA-mRNA expression in the brain during high temperature-induced masculinization of female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genomics*, 110856.
- Jorge, P. H., Mastrochirico-Filho, V. A., Hata, M. E., Mendes, N. J., Ariede, R. B., Freitas, M. V. D., ... & Hashimoto, D. T. (2018). Genetic characterization of the fish *Piaractus*

- brachypomus by microsatellites derived from transcriptome sequencing. *Frontiers in Genetics*, 9, 46.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.
- Li, R., Qu H, Wang S, Wei J, Zhang L, Ma R, Lu J, Zhu J, Zhong WD, Jia Z. GDCRNATools: an R/Bioconductor package for integrative analysis of lncRNA, miRNA and mRNA data in GDC. *Bioinformatics*. 2018;34(14):2515–7.
- Li, W., Notani, D., & Rosenfeld, M. G. (2016). Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nature Reviews Genetics*, 17(4), 207-223.
- Li, Z., Shou, C., Sun, S., Han, Z., & Liu, Q. (2024). Identification and construction of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA networks associated with temperature changes in *Sebastiscus marmoratus*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 42(6), 1957-1975.
- Liu, S., Yu, T., Zhang, Y., Pan, C., Cai, L., & Yang, M. (2021). Integrated analysis of mRNA and long non-coding RNA expression profiles reveals the potential roles of lncRNA-mRNA network in carp macrophage immune regulation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 57, 835-847.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 1-21.
- Maere, S., Heymans, K., Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 21(16), 3448–9.
- Mareco, E. A., de la Serrana, D. G., de Paula, T. G., Zanella, B. T. T., da Silva Duran, B. O., Salomão, R. A. S., ... & Dal-Pai-Silva, M. (2023). Transcriptomic insight into the hybridization mechanism of the Tambacu, a hybrid from *Colossoma macropomum* (Tambaqui) and *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 45, 101041.
- Mateussi, N. T., Melo, B. F., Ota, R. P., Roxo, F. F., Ochoa, L. E., Foresti, F., & Oliveira, C. (2020). Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial classification (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 153, 106945.
- Papadaki, M., Kaitetzidou, E., Mylonas, C. C., & Sarropoulou, E. (2020). Non-coding RNA expression patterns of two different teleost gonad maturation stages. *Marine Biotechnology*, 22, 683-695.

- Quan, J., Zhao, G., Liu, Z., Li, L., Lu, J., Song, G., & Kang, Y. (2023). Competing endogenous RNA (ceRNA) in a non-model animal: Non-coding RNAs respond to heat stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through ceRNA-regulated mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 239, 124246.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *Cell*, 146(3), 353-358.
- Sarropoulou, E., & Fernández, I. (2023). Epigenetic regulation of gene expression by noncoding RNAs. *Epigenetics in Aquaculture*, 65-93.
- Shen, X., Yan, H., Hu, M., Zhou, H., Wang, J., Gao, R., ... & Liu, Y. (2024). The potential regulatory role of the non-coding RNAs in regulating the exogenous estrogen-induced feminization in *Takifugu rubripes* gonad. *Aquatic Toxicology*, 273, 107022.
- Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P. L., Ideker, T. (2011). Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*, 27(3), 431-2.
- Tao, W., Sun, L., Shi, H., Cheng, Y., Jiang, D., Fu, B., ... & Wang, D. (2016). Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in tilapia gonads at an early stage of sex differentiation. *BMC Genomics*, 17, 1-13.
- Tang, L., Huang, F., You, W., Poetsch, A., Nóbrega, R. H., Power, D. M., ... & Shao, C. (2022). ceRNA crosstalk mediated by ncRNAs is a novel regulatory mechanism in fish sex determination and differentiation. *Genome Research*, 32(8), 1502-1515.
- Tay, Y., Rinn, J., & Pandolfi, P. P. (2014). The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature*, 505(7483), 344-352.
- Taylor, D. H., Chu, E. T. J., Spektor, R., & Soloway, P. D. (2015). Long non-coding RNA regulation of reproduction and development. *Molecular Reproduction and Development*, 82(12), 932-956.
- Wang, Q., Deng, J., Jiang, Y., Wang, Z., Xia, B., & Chen, T. (2024). A medaka gonad-specific lncRNA may act as pri-miR-202 to regulate testicular endocrine homeostasis and spermatogenesis. *Theriogenology*, 214, 273-285.
- Wang, Y. Y., Duan, S. H., Wang, G. L., & Li, J. L. (2021). Integrated mRNA and miRNA expression profile analysis of female and male gonads in *Hyriopsis cumingii*. *Scientific Reports*, 11(1), 665.
- Yan, H., Liu, Q., Jiang, J., Shen, X., Zhang, L., Yuan, Z., ... & Liu, Y. (2021). Identification of sex differentiation-related microRNA and long non-coding RNA in *Takifugu rubripes* gonads. *Scientific Reports*, 11(1), 7459.

- Yang, C., Zhao, Y., Zhao, W., Huang, H., Zhang, Q., & Liu, J. (2025). CeRNA profiling and the role in regulating gonadal development in gold pompano. *BMC Genomics*, 26(1), 43.
- Zarkou, V., Galaras, A., Giakountis, A., & Hatzis, P. (2018). Crosstalk mechanisms between the WNT signaling pathway and long non-coding RNAs. *Non-coding RNA Research*, 3(2), 42-53.
- Zhao, N., Jia, L., He, X., & Zhang, B. (2021). Sex bias miRNAs in *Cynoglossus semilaevis* could play a role in transgenerational inheritance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 39, 100853.
- Zhong, A., & Yan, X. (2025). Erythropoiesis in Teleost Fishes: The Fantastic Biological Process. *Reviews in Aquaculture*, 17(1), e12960.
- Zhou, C. Q., Ka, W., Yuan, W. K., & Wang, J. L. (2021). The effect of acute heat stress on the innate immune function of rainbow trout based on the transcriptome. *Journal of Thermal Biology*, 96, 102834.
- Zhou, Z., Leng, C., Wang, Z., Long, L., Lv, Y., Gao, Z., ... & Li, P. (2023). The potential regulatory role of the lncRNA-miRNA-mRNA axis in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, 14, 1065357.