

USO DO SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL E
TRIDIMENSIONAL PARA DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO ESPERMATOGÔNIAIS E INDUÇÃO DA
ESPERMATOGÊNESE *IN VITRO* EM MURINOS

CAMILA CHAVIER MACEDO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcioanal

Fernanda da Cruz Landim

**BOTUCATU – SP
2012**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

USO DO SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL E
TRIDIMENSIONAL PARA DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO ESPERMATOGÔNICIAS E INDUÇÃO DA
ESPERMATOGÊNESE IN VITRO EM MURINOS

CAMILA CHAVIER MACEDO

FERNANDA DA CRUZ LANDIM

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Fernanda da Cruz Landim

**BOTUCATU – SP
2012**

*Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Macedo, Camila Chavier.

Uso do sistema de cultivo bidimensional e tridimensional para diferenciação de células-tronco espermatogônias e indução da espermatogênese *in vitro* em murinos / Camila Chavier Macedo. – Botucatu : [s. n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 20600003

1. Espermatogênese. 2. Células-tronco. 3. Reprodução.

Palavras-chave: Células-tronco espermatogonial (SSC); Cultivo celular bidimensional; Cultivo celular tridimensional; Diferenciação; Espermatogênese.

DEDICATÓRIA

Aos meus grandes guerreiros,
meus pais;
e ao meu engenheiro
poeta, meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me transformarem no que hoje eu sou, pelos constantes ensinamentos, pelo suporte nas minhas mais loucas escolhas e pelos inúmeros esforços, muitas vezes, acima dos seus próprios limites, pela minha felicidade.

Ao meu irmão, que apesar de caçula, muitas vezes eu aprendo muito mais com ele do que ele comigo.

*A minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Fernanda da Cruz Landim**, pelo carinho, amizade e todo o apoio desde a graduação.*

*À **Prof.^a Dr.^a Renee Laufer Amorim** por disponibilizar o seu laboratório e compartilhar os seus conhecimentos.*

*À **Isadora Arruda** não só pela incansável ajuda, mas também pela nova amizade.*

*Aos meus amigos de laboratório: **João, Paulinho, Ian, Midyan, Luís Eduardo, Amanda, Leticia, Rosiara, Cely, Luís, Vinicius, Camila** pela contribuições diretas ou indiretas.*

*Aos técnicos do Biotério Central, **Luiz Carlos Diniz, Leonardo Gagliani, José Rafael Franco** pela imensa ajuda prestada durante todo o experimento.*

*Aos **camundongos Swiss**, sem os quais este experimento não seria possível.*

*Ao técnico "**Zé**", não só pelo prontidão no processamento dos materiais, mas também por ser sempre tão atencioso.*

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (FMVZ) pela convivência sempre cordial.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pelo apoio auxílios financeiros, bolsa e auxílio pesquisa (Processos: 2009/13320-8 e 2010/14930-1).

MUITÍSSIMO OBRIGADA!!!!

EPÍGRAFE

“Por não saber que era impossível
Ele foi lá e fez”.
(Jean Cocteau)

SUMÁRIO

1. <i>Resumo</i>	7
2. <i>Abstract</i>	8
3. <i>Introdução</i>	9
4. <i>Revisão de Literatura</i>	
4.1. <i>Definição de Célula-Tronco e Classificação</i>	10
4.2. <i>Breve Histórico da Espermatogênese in vitro</i>	11
4.3. <i>Espermatogênese in vivo</i>	12
4.4. <i>Origem das Células-Tronco Espermatogônias (SSC) e Diferenciação das Células Espermatogênicas</i>	12
4.5. <i>Cultivo das SSC</i>	
4.5.1. <i>Sistema de Cultivo Bidimensional</i>	15
4.5.2. <i>Sistema de Cultivo Tridimensional</i>	18
4.5.3. <i>Meio de Cultivo</i>	
4.5.3.1. <i>Meios de Cultivos Básicos</i>	19
4.5.3.2. <i>Adição de Gonadotrofinas (FSH e hCG)</i>	19
4.5.3.3. <i>Soro Fetal e Suplementos</i>	20
5. <i>Objetivos e Hipótese</i>	21
6. <i>Capítulo</i>	
<i>Título</i>	22
<i>Introdução</i>	27
<i>Materias e Métodos</i>	27
<i>Resultados</i>	30
<i>Discussão</i>	32
<i>Referências</i>	37
7. <i>Conclusão</i>	40
8. <i>Referências da Introdução</i>	41

RESUMO

1. RESUMO

Introdução: O estudo da espermatogênese e, conseqüentemente, das células-tronco espermatogoniais (SSC), podem acarretar descobertas de novos conhecimentos sobre a biologia dessas e de outros tipos de células-tronco (SC) adultas, bem como, futuramente, proporcionar tratamentos para infertilidade masculina, entendimento sobre a origem e formação de tumores testiculares, conservação de espécies em extinção e melhoramento genético de animais de produção, entre outros temas importantes em medicina reprodutiva. No entanto, os sistemas de cultivos e composição dos meios utilizados para induzir a espermatogênese *in vitro*, à partir de SSC, não são totalmente conhecidos. Desta forma, o objetivo geral deste experimento foi estudar a diferenciação celular e a indução da espermatogênese *in vitro* de SCC oriundas da digestão testicular de camundongos Swiss (entre 6-10 dias pós-parto, dpp) cultivadas em diferentes sistemas: o bidimensional (2D) ou convencional e o tridimensional (3D). **Materias e métodos:** Para tanto, após a digestão testicular, a suspensão celular foi transferida para placas cobertas por uma fina camada de ágar (sistema 2D). Enquanto, uma camada mais espessa de ágar (SACS - Soft Ágar Culture System) ou metilcelulose (MCS – Methylcellulose Culture System) foram confeccionadas para mimetizar a disposição celular *in vivo* (sistema 3D). Além disso, também foram avaliados o efeito da adição de gonadotrofinas ao meio de cultivo, em ambos os sistemas. **Resultados:** A formação e manutenção de clusters de espermatogônias foram mais visíveis nas placas contendo gonadotrofinas, independente do sistema de cultivo. Porém, o sistema de cultivo 3D-MCS-gonadotrofinas(+) mostrou-se mais vantajoso em relação ao sistema de cultivo 2D, uma vez que beneficiou a neoformação de estruturas císticas semelhante a luz dos túbulos seminíferos, além de resultar em suspensão celular, o que favorece recuperação e caracterização das células pós cultivo. **Conclusão:** Conclui-se que o sistema 3D-MCS-(+) apresentou-se mais fiel a organização espacial encontrada *in vivo*. No entanto, o potencial de fertilização dessas espermátides redondas e em alongamento é desconhecido, necessitando de novos experimento.

ABSTRACT

2. ABSTRACT

Introduction: The study of spermatogenesis and spermatogonial stem cells (SSC) may result in the discovery of new knowledge about the biology of these and other types of adults stem cells (SC). In the future, could be provided treatments for male infertility , understanding the origin and formation of testicular tumors, preservation of endangered species and genetic improvement of livestock and others importants issues in reproductive medicine. However, culture systems and composition of culture media used to induce spermatogenesis *in vitro* from the SSC are not fully understood. Thus, the goal of this experiment was to study the induction of those cells differentiation and spermatogenesis *in vitro* from the testicular digestion of Swiss mice 6-10dpp cultivated in different systems: the two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D). **Materials and methods:** After testicular digestion, the suspension cell was transferred to plates coated with a thin layer of agar (2D). While a thicker layer of agar (SACS - Soft Agar Culture System) or methylcellulose (MCS – Methylcellulose Culture System) were made to mimic the *in vivo* cell (3D). We also evaluated the effect of the addition of gonadotropins. **Results:** The cluster formation and maintenance of spermatogonia was more visible on gonadotropins (+), in both systems. . However, the 3D-MCS(+) was more advantageous compared to 2D culture system because benefited the formation of clusters of spermatogonia and also the newly formed cystic structures similar to lumen of the tubules seminiferous tubules. **Conclusion:** We could concluded that the 3D-MCS(+) culture demonstrated better spatial organization found *in vivo*. However, the potential fertility of these round spermatids and elongation is unknown, requiring further experiments.

***INTRODUÇÃO E
REVISÃO LITERATURA***

3. INTRODUÇÃO

Os tecidos biológicos estão em constante e espontânea autorrenovação e autorreparação, cujos os mecanismos estão relacionados a utilização das reservas de células-tronco (SC) tecido-específico. Assim, quando um tecido é perdido, ferido ou lesionado essas reservas de SC tentam repor ou reparar essas células. No entanto, quando a reparação tecidual espontânea está incapacitada, a medicina regenerativa busca através da terapia celular reparar o tecido lesionado pelo uso das SC (ALBERTS et al, 2010).

As células-tronco são definidas como células com capacidade de auto-renovação (gerar novas células semelhante a ela) e diferenciação -gerar novas células diferenciadas, progenitoras (MINGRONI-NETTO & DESSEN, 2006).

Os primeiros estudos envolvendo a aplicação de SC tiveram início com as células-tronco hematopoiéticas. No decorrer do século XX, a transfusão de componentes sanguíneos foi desenvolvida, consolidada e, hoje, o transplante de medula óssea, é a terapia celular mais difundida (ZAGO & COVAS, 2006). Inicialmente, conhecia-se poucos tipos SC adulta como medula óssea, pele, intestino e testículos. Nos últimos anos, foram descobertas em outras regiões como: fígado, polpa de dente, pâncreas, sistema nervoso, córnea, retina, gordura e sangue menstrual, entre outras.

As células-tronco adultas encontradas no testículo, também denominadas espermatogônias-tronco, células-tronco espermatogoniais (SSC) ou células-tronco germinativas (GSC), são únicas porque são oriundas de tecido jovem e/ou adulto, e não embrionária; possuem capacidade de auto-renovação, diferenciação, como outras SC; são responsáveis pela transmissão genética e, em estudos recentes, demonstraram sua notável plasticidade, cuja capacidade é gerar tipos celulares diferentes do folheto germinativo de origem, característica evidente até então somente em SC embrionária (KUBOTA & BRINSTER, 2008).

Há quase um século, estudos sobre a espermatogênese *in vitro* buscam a compreensão da auto-renovação e diferenciação das células germinativas testiculares. Os primeiros estudos revelaram a necessidade da manutenção da estrutura do epitélio testicular e a preservação da interação entre células somáticas e germinativas. Além disso, estes autores conseguiram promover *in vitro*, ainda que apresentasse meios de cultivo mais simples em relação aos padrões atuais, a progressão das espermatogônias até a meiose, mas não chegaram concluir a

espermatogênese (GOLDSCHMIDT, 1915; MICHAILOW, 1937; STEINBERGER et al, 1964; STEINBERGER & STEINBERGER, 1966, 1970).

Nos últimos anos, os pesquisadores tem buscado definir quais os fatores de crescimento e hormonais necessários para promover *in vitro* a auto-renovação e diferenciação das espermatogônias. A presença de fatores de crescimento nos meios de cultivo, como o fator neurotrófico derivada das células da glia (GDNF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator inibitória de leucemia (LIF) em placas cobertas com uma fina camada de gelatina permitiram o isolamento e amplificação, por meses, das SSC, fornecendo uma ferramenta importante para exploração das células germinativas masculina (MIGUEL et al, 1996; MENG et al, 2000; KANATSU-SHINOHARA et al, 2003; KUBOTA et al, 2004a, b).

Entretanto, até agora, o sistema de cultivo utilizado, a composição do meio e sua suplementação para o desenvolvimento completo *in vitro* da espermatogênese é muito discutido, pois os resultados são promissores, mas ainda estão longe de um número suficiente de espermatozoides viáveis e com potencial fertilização.

4.REVISÃO DE LITERATURA

4.1.DEFINIÇÃO DE CÉLULA-TRONCO E CLASSIFICAÇÃO

As SC podem ser classificadas de acordo com o local de origem e o grau de potencialidade em: embrionárias (eSC) ou adultas; e totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes, respectivamente (MINGRONI-NETTO & DESSEN, 2006).

As SC totipotentes, como os blastômeros até estágio de mórula pré-compactação, são capazes de gerar por si só um indivíduo completo, incluindo os anexos placentários. Enquanto, as eSC, derivadas da massa celular interna (IMC) de blastocistos é pluripotente – cuja potencialidade é originar mais de 200 tipos celulares, derivados dos três folhetos germinativos, exceto os anexos extraembrionários. Por outro lado, as células-tronco adultas, mantidas em reserva nos tecidos, são denominadas multipotentes, nas quais a capacidade é originar múltiplos tipos celulares mas com uma origem comum, como as SC da medula óssea. Finalmente, as SC unipotentes são capazes de originar só um tipo celular, tais como as células da camada

germinativa da epiderme e como era definidas as espermatogônias no testículos ((MINGRONI-NETTO & DESSEN, 2006; BARROCA ET AL, 2008).

4.2. BREVE HISTÓRICO DA ESPERMATOGÊNESE IN VITRO

Os primeiros estudos sobre a espermatogênese *in vitro* tentaram cultivar fragmentos de tecido testicular de várias espécies obtendo sucesso na progressão da meiose, embora utilizassem meios de cultivo mais simples em relação aos padrões atuais, sem, no entanto, chegarem a concluir a espermatogênese. Esses experimentos revelaram a necessidade da manutenção estrutural do tecido testicular e a preservação da interação entre células somáticas e germinativas (GOLDSCHMIDT, 1915; CHAMPY, 1920; MICHAILOW, 1937). Esses trabalhos foram abandonados e somente retomados durante a década de 1970. O resultado foi que o cultivo de fragmentos testicular melhorava quando co-cultivados com células de Sertoli isoladas (STEINBERGER et al. 1964; STEINBERGER & STEINBERGER, 1966, 1970). Assim, pode-se concluir que a presença de uma monocamada de células somáticas, constituída, principalmente de células Sertoli, parece ser fundamental para o estabelecimento da diferenciação (STEINBERGER et al. 1964; STEINBERGER & STEINBERGER, 1966, 1970; STUKENBORG et al, 2008, 2009; DONG et al, 2009). Nas últimas duas décadas, inúmeros trabalhos tentaram induzir a diferenciação *in vitro* de células germinativas (GC, ASLAM & FISHEL, 1998; TESARIK et al, 1998a, b; TANAKA et al, 2003) ou de espermátides redondas ou alongadas (CREMADES et al, 1999, 2001), mas a espermatogênese completa desde as SSC até os espermatozóides só foi evidenciado por DONG et al (2010); STUKENBORG et al (2008, 2009); ELHIJA et al (2011); SATO et al, 2011a; 2011b).

Utilizando um sistema de cultivo convencional (2D), Dong et al (2010) conseguiram induzir a espermatogênese *in vitro*, onde as SSC isoladas, enriquecidas foram cultivadas sobre uma monocamada de células de Sertoli. Enquanto, Stukenborg et al (2009, 2010) e Elhija et al (2011) produziram espermatozóides à partir de SSC empregando sistema de cultivo 3D. Já, Sato et al (2011a, 2011b) produziram espermatozóides ao retomar os estudos iniciais com fragmentos testiculares.

4.3. ESPERMATOGÊNESE IN VIVO

Os espermatozóides são produzidos pelas espermatogônias, presentes nos testículos, após a puberdade, durante toda a vida, em um processo denominado espermatogênese. Esse processo é altamente coordenado, complexo, contínuo e constituído de três fases distintas (SHARPE, 1994): na primeira fase, fase mitótica ou proliferativa, as espermatogônias sofrem auto-renovação ou diferenciação, ambos envolvendo sucessivas divisões mitóticas até a formação do espermatócito primário préleptóteno (CLERMONT, 1962); esse entra na segunda fase ou fase meiótica, caracterizada pela divisão meiótica e a recombinação genética, resultando na formação de células haplóides (STERN, 1993); e na terceira fase, fase pós-meiótica ou espermiogênese, o citoesqueleto é rearranjado, transformando as espermátides, haplóides, em células altamente especializadas, os espermatozóides (CLERMONT et al, 1993).

A espermatogênese é iniciada por uma população pequena, entre 0,02-0,03%, de SSC presente nos testículos de camundongos adultos (DE ROOIJ & RUSSEL, 2000), residentes em microambientes especializados na membrana basal dos túbulos seminíferos (DE ROOIJ & GROOTEGOED, 1998), que se submetem a divisões, tanto para manter o número de SSC, quanto para originar as células progenitoras que depois se desenvolverão até espermatozóides.

A função da maioria, se não toda, a população de células-tronco adulta é fundamentada dentro desses microambientes especializados, chamados de nichos, que fornecem estímulos extrínsecos para regular a auto-renovação e diferenciação, através de um estrutura arquitetônica de suporte e estimulação de fatores de crescimento (SPRANDLING et al, 2001; SCADDEN, 2006). Desta maneira, o nicho pode ser definido como uma área no tecido, na qual as SC residem e são mantidas ao longo da vida (DE ROOIJ, 2009). Nos testículos de mamíferos, as principais contribuintes do nicho são as células de Sertoli, além de outras células somáticas testiculares, como as células mióides e células de Leydig.

4.4. ORIGEM DAS CÉLULAS-TRONCO ESPERMATOGÔNIAS (SSC) E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS

O começo da formação do nicho, ocorre durante o desenvolvimento pós-natal, coincidindo com a maturação das células de Sertoli. O número de nichos de SSC é variável e muda de acordo com a idade, aumentando durante o período pós-natal até a maturidade sexual,

quando, em camundongos, o número se torna estável (SHINOHARA et al, 2001), mas pode aumentar em espécies, como ratos, cujos testículos aumentam durante a vida (RUY et al, 2003).

As SSC surgem dos precursores de gonócitos mais indiferenciados, derivadas das células germinativas primordiais (PGC), que migram do ectoderma extra-embriônico para a protuberância urogenital e formam, juntamente com as células precursoras somáticas gonadais, a gônada embrionária (CLERMONT & PEREY, 1957; SAPSFORD, 1962; MCLAREN, 2003). Após migrarem, multiplicarem e colonizarem as gônadas, as PGC se diferenciam em gonócitos, que permanecem quiescentes até o período pós-natal em camundongos ou até 3 dias pós-parto (dpp) em ratos, aproximadamente. Em seguida, os gonócitos femininos são induzidos ao início da meiose, devido a ação do ácido retinóico (AR) que leva a expressão do *Stra8* – gene expresso pelas células germinativas, o qual codifica uma proteína citoplasmática, cuja expressão é induzida pelo AR (MCLAREN, 2003; MACLEAN et al, 2007). Ao contrário, os gonócitos masculinos estacionam o seu ciclo celular em G1/G0. Na gônada masculina fetal a meiose é retardada devido à inibição da sinalização do AR pela ação da enzima CYP26B1, cuja expressão é regulada pelas células de Sertoli. Quando ocorre a remoção desta enzima ou adição de AR, reinicia-se a meiose.

Segundo Huckins (1971) e Oakberg (1971), as espermatogônias podem ser classificadas em nove tipos diferentes em roedores, sendo subdivididas em três tipos: tipo A, tipo intermediária (In) e tipo B. As espermatogônias tipo A ainda podem ser divididas em subtipos indiferenciados: A_s (singular), A_{pr} (pareadas) e A_{al} (alinhadas); e diferenciados, A_1 , A_2 , A_3 e A_4 . Considera-se SSC as A_s , pois este é o tipo mais primitivo, não possuindo pontes intracelulares. As espermatogônias do subtipo indiferenciadas não são indistinguíveis morfológicamente, por microscopia de luz ou por colorações, em relação as espermatogônias diferenciadas. Existem inúmeras hipóteses para explicar a renovação e diferenciação das SSC. A hipótese mais aceita é de que as espermatogônias A_s se dividem por mitose em duas células-filha, mantendo o pool de células-tronco, ou se diferenciando em um par de células A_{pr} que não completam a citocinese, mantendo-se conectadas por uma ponte intracelular (DE ROOIJ & RUSSEL, 2000; DE ROOIJ, 2001). Em seguida, as espermatogônias A_{pr} se dividem por mitose formando cadeias de 4, 8 e 16 células, passando a ser denominadas espermatogônias A_{al} , que se diferenciam em espermatogônias A_1 , sem sofrer divisão. As espermatogônias A_1 sofrem sucessivas divisões mitóticas, formando as espermatogônias A_2 , A_3 e A_4 . As espermatogônias A_4 amadurecem em

espermatogônias In e B, que sofrem divisões meióticas resultando em espermatídes. As espermatídes, após o processo de espermiogênese, culmina com formação dos espermatozóides.

Está definida há décadas, o período da aparição de cada célula espermática nos testículos de camundongos. Em camundongos neonatos (dia zero), as únicas células presentes, localizados no centro dos túbulos seminíferos (VERGOUWEN et al, 1993; NAGANO & BRINSTER, 1998), são os gonócitos. Entre o período 0 e 6 ddp, ocorre a transição dos gonócitos, que migram para a membrana basal e se transformam em SSC ou espermatogônias tipo A (HUCKINS & CLERMONT, 1968; BELLVE et al, 1977; DE ROOIJ, 1998; DE ROOIJ & RUSSELL 2000; NAGANO et, 2000; MCLAREN, 2003). As primeiras divisões das SSC ocorrem por volta do 3-4 dpp (MCLEAN, 2003). Em outras espécies, a transição de gonócitos para SSC pode demorar meses ou anos, como touro e humanos, respectivamente. Em seguida, as espermatogônias do tipo A se diferenciam em In e B. Já, os espermatócitos em paquíteno e as espermatídes redondas e alongadas se desenvolvem no período entre 10-12, 15-17, 19-21 e 23-25 dpp, respectivamente em camundongos (BELLVÉ et al, 1977).

4.5. CULTIVO DAS SSC

Os sistemas de cultivo convencionais ou bidimensionais (2D) utilizam placas ou garrafas (DIRAMI et al, 1999; FENG et al, 2002; HASTHORPE, 2003; NAGANO et al, 2003; KUBOTA et al, 2004a, b; KANATSU-SHINOHARA et al 2004, 2005a,b) cobertas por uma fina camada de colágeno, matrigel, gelatina, ágar ou outros componentes da matriz extracelular (MEC), nas quais células germinativas são cultivadas em presença destes elementos. Enquanto, o sistema de cultivo tridimensional (3D) apresenta uma camada mais espessa de ágar, metilcelulose ou colágeno (LEE et al, 2006, 2007; STUKENBORG et al, 2008, 2009; ELHIJA et al, 2011; SATO et al, 2011a, b).

A arquitetura do epitélio dos túbulos seminíferos está organizada em membrana basal, intraepitelial e compartimento adluminal (STAUB, 2001). Esse fato pode influenciar, negativamente, o desenvolvimento *in vitro* das SSC no sistema de cultivo 2D, especialmente porque as células em meiose são envolvidas pelas células de Sertoli, assim como os clones interconectados, e não possuem contato direto com a membrana basal ou o compartimento adluminal, devido a barreira hematotesticular. Sendo assim, o sistema de cultivo 3D parece apresentar uma estrutura mais vantajosa para diferenciação *in vitro* das SSC (LEE et al 2006; LEE et al, 2007; STUKENBORG et al, 2008, 2009; ELHIJA et al, 2011; SATO et al, 2011a, b).

Durante a década de 1960-70, conclui-se que a incubação a uma temperatura inferior a temperatura corpórea é benéfica para o sucesso da espermatogênese *in vivo e in vitro* (STEINBERGER et al. 1975; NAKAMURA et al, 1978; MIEUSSET & BUJAN, 1995). Além da escolha do sistema de cultivo, presença das células de Sertoli, temperatura, outros fatores foram sendo descobertos durante e decisivos para a cultura testicular, como idade do doador, a monocamada de sustentação, o soro fetal e a composição do meio de cultivo, descritos a seguir.

A idade do doador de SSC esta relacionado com a qualidade e quantidade das SSC recuperada para o cultivo celular. Demonstrou-se que as CG de animais pré-púberes são duas vezes mais viáveis em comparação com os estágios mais avançados (CREEMERS et al., 2002) e a proporção de espermatogônias indiferenciadas é 100 vezes maior em testículos de camundongos imaturos quando comparados com os testículos de adultos (DE ROOIJ & RUSSELL, 2000; MCLEAN et al., 2003; APONTE et al., 2005). Portanto, o tecido testicular de camundongos imaturos apresenta melhores condições de cultivo em relação a testículos adultos, devido ao fornecimento de um maior número de SSC iniciais levando a melhores taxas de sobrevivência. Desta forma, recomenda-se o isolamento das células germinativas do tecido testicular de camundongos imaturos entre o período 6-10 dpp, uma vez que é neste período que ocorre a diferenciação dos gonócitos em SSC e espermatogônias, sem, no entanto, haver o desenvolvimento dos espermatócito primários (BELLVÉ et al, 1977).

4.5.1.SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL

Apesar de existirem diferentes métodos para manutenção das população de SSC, ainda continua laborioso obter um grande número destas células tronco, devido, especialmente, a lenta proliferação deste tipo celular. Os primeiros experimentos evidenciaram que as primeiras duas semanas de cultura de SSC são fundamentais, pois a sobrevivência das SSC é sensível as condições de cultivo (NAGANO et al, 2003; KUBOTA et al, 20004a).

É imprescindível para o estabelecimento de uma cultura de SSC, por longo período, que a população celular inicial seja pura, pois se a concentração inicial de células somáticas for extremamente elevada, elas podem crescer sobre as SSC. Além disso, algumas células somáticas possuem efeitos deletérios sobre os mecanismos de autorrenovação e expansão das SSC. Assim, é necessário que a população inicial de SSC seja enriquecida. Para tanto, há vários métodos, tais como: plaqueamento diferencial (SHINOBARA et al, 2000); seleção por laminina (NAYERNIA

et al, 2004; HAMRA et al, 2008); sedimentação gravitacional por Percoll (VAN PELT, 1996; KOH et al, 2004); separação por fluorescência (FACS, SHINOHARA et al, 1999; FUJITA et al, 2005; GUAN et al, 2006) e separação por campo magnético (MACS; VON SCHÖNFELDT et al, 1999; KUBOTA et al, 2004a, b; STUKENBORG et al, 2008, 2009). Esse último método, é considerado o mais rápido e o que causa o menor estresse para as espermatogônias.

Inicialmente, diversos trabalhos procuraram definir o meio de cultivo das SSC, porque, apesar do soro ter sido utilizado para promover a proliferação de alguns tipos celulares, a sua presença, dependendo das condições ou do sexo do doador, pode ser tóxica para outras células, devido a expressão fatores inibitórios. Ou ainda, causar a morte das células germinativas, especialmente em razão do crescimento exagerado de tipos celulares contaminantes, como os fibroblastos. Deste modo, ao meio de enriquecimento de SSC foram adicionados diversos fatores de crescimento para compensar a retirada do soro, dentre eles, destacam-se: o fator inibitório de leucemia, (LIF; DE MIGUEL et al 1996; KANATSU-SHINOHARA et al, 2003), o fator neurotrófico derivado das células glia (GDNF; MENG et al, 2000; KANATSU-SHINOHARA et al, 2003; KUBOTA et al, 2004a, b), receptor $\alpha 1$ da família do GDNF (GFR $\alpha 1$, KUBOTA et al, 2004a); fator básico de crescimento de fibroblasto, (bFGF; KANATSU-SHINOHARA et al, 2003; KUBOTA et al, 2004a,b) e fator de célula-tronco (SCF; ALLARD et al, 1996; BLANCHARD et al, 1998; DE ROOIJ et al, 1998; KUBOTA et al, 2004a). Kubota et al (2004b) utilizando um meio quimicamente definido livre de soro, composto por GDNF, GFR $\alpha 1$ e bFGF, promoveram, expressivamente, a expansão das SSC cocultivadas em uma monocamada de células STO-SIM (mouse embryo-derived Thioguanine and Ouabain resistant- linhagem de fibroblasto derivado de embrião de camundongo mitoticamente inativados) por até 6 meses. Esses trabalhos também evidenciaram, que o GDNF é um fator de crescimento essencial para auto-renovação das SSC de camundongo *in vitro* (KUBOTA et al, 2004a, b; KANATSU-SHINOHARA et al, 2005a).

A presença de uma *feeder* (monocamada de sustentação celular) pode estimular as células cocultivadas, não só pela presença de fatores de crescimentos, mas também pelo contato direto célula-célula ou via matriz celular. Entretanto, uma desvantagem da utilização das *feederes* é a produção fatores de crescimento desconhecidos. Desta forma, os sistemas de cultivos que utilizam *feederes*, procuram utilizar linhagem celulares bem conhecidas, minimizando as variáveis das condições de cultivo. NAGANO et al (1998) demonstraram que as SSC em meios

de cultivo não definidos, cocultivadas sobre *feeder* de células STO podem ser mantidas por meses. Posteriormente, Kanatsu-Shinohara et al (2003) utilizaram como *feeder* o cultivo primário de fibroblasto embrionário de camundongos (MEF). Entretanto, Kubota & Brinster (2008), ao comparar a utilização de MEF com a *feeder* de STO, observaram que a *feeder* de MEF suporta um crescimento medíocre dos *clusteres* (colônias) de CG, o qual não se compara ao crescimento mais veloz na *feeder* de células STO. Além disso, estudos recentes, comprovaram que fibroblastos de origens anatômicas diferentes são significativamente diferentes e que existe uma heterogeneidade substancial entre os fibroblastos embrionários (CHANG et al, 2002). Hamra et al (2004, 2005), demonstraram que a *feeder* de linhagem de células de Sertoli de camundongo (MSC-1) é superior a *feeder* STO na manutenção das CG, porém as CG foram cocultivadas por um período curto. Kubota & Brinster (2008), demonstraram que a *feeder* de MSC-1 suporta as CG, mas o crescimento é lento e, após nove dias de cocultivo com as CG em monocamada de MSC-1, a maioria das CG morreram. Desses experimentos, pode-se concluir que a *feeder* de células STO parece ser superior.

Por outro lado, Kanatsu-Shinohara et al (2005), tentaram cultivar as SSC livre de soro e *feeder* e, embora as células tenham se mantido em proliferação em meio livre de soro ou em ausência de *feeder*, na ausência de ambos, as SSC não proliferaram.

O último passo do sistema de cultivo 2D é a espermatogênese *in vitro*, propriamente dita, na qual as SSC são induzidas a meiose promovendo a produção de células haplóides. Como já vimos anteriormente, é necessário a presença das células de Sertoli para indução da espermatogênese *in vitro*, devido ao importante papel dessas células durante esse processo (STEINBERGER et al. 1964; STEINBERGER & STEINBERGER, 1966, 1970; DIRAMI et al, 1999; IZADYAR et al, 2003; DONG et al, 2010; STUKENBORG et al, 2008, 2009).

Desta forma, uma população altamente isolada de SSC, expandida por um cultivo em meio quimicamente definido, livre de soro, sobre uma monocamada de células STO, pode ser induzida a diferenciação, quando cultivadas sobre uma *feeder* de células de Sertoli, mitoticamente inativada. Assim, empregando um sistema de cultivo 2D, Dong et al (2009) conseguiram induzir a espermatogênese *in vitro*, onde as SSC foram isoladas, enriquecidas e, depois, cultivadas sobre uma monocamada de células de Sertoli isoladas.

4.5.2.SISTEMA DE CULTIVO TRIDIMENSIONAL

O sistema de cultivo tridimensional (3D) foi estabelecido, primeiramente, para explorar os mecanismos de proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas (PARENT-MASSIN, 2001). Desde então, este novo modelo de cultivo celular é considerado um representante autêntico do ambiente celular *in vivo* e tem recebido muita atenção no campo da biologia celular (PARKS et al, 2003; ZHANG, 2004). Da mesma forma que os primeiros estudos *in vitro*, os estudos *in situ* da espermatogênese também relataram que a disposição estrutural das células testiculares é importante para a regulação e completa maturação das células germinativas (GOLDSCHMIDT, 1915; CHAMPY, 1920; MICHAILOW, 1937; STEINBERGER et al. 1964; STEINBERGER & STEINBERGER, 1966, 1970; LEE et al, 1997; NAGANO et al, 2003; WISTUBA et al, 2007). Devido ao microambiente *in vivo* criado pelas células testiculares somáticas, o epitélio é compartimentado em: i) compartimento basal, que oferece contato físico com a membrana basal, onde estão as células de Sertoli e as CG prémeióticas, inclusive as SSC; ii) o compartimento intraepitelial, cujo contato é somente com células de Sertoli e CG em transição meióticas e iii) o compartimento adluminal, cujo contato é com as células Sertoli e CG pós-meióticas em processo de diferenciação, assim como, com o fluido luminal (SPRADLING et al, 2001). Portanto, um sistema de cultivo ideal deve mimetizar a organização estrutural do epitélio seminífero *in situ* promovendo as interações entre células somáticas-germinativas ou entre células germinativas-matriz extracelular durante a espermatogênese *in vitro*. Assim, os sistemas de cultivos convencionais parecem não refletir essa complexa estrutura do epitélio seminífero, por não fornecerem a organização espacial presente *in vivo*, que pode dificultar a viabilização da diferenciação das espermatogônias e sustentação da espermatogênese (STAUB, 2001).

O sistema de cultivo 3D é composto por uma camada mais espessa de colágeno, ágar ou metilcelulose. Essa camada possui vários milímetros até centímetros, proporcionada por um sistema de cultivo em ágar (SACS- Soft Agar Culture System), sistema de cultivo de metilcelulose (MCS) ou uma matriz de colágeno mais encorpada, onde as células cultivadas são envolvidas pelos substratos. Desta maneira, tenta-se recriar a arquitetura do tecido testicular *in vivo*, ao possibilitar que as CG sejam acondicionadas em condições semelhantes às condições espaciais testiculares. Além disso, o sistema de cultivo 3D parece evitar a isquemia que dificulta cultivos de longa duração e promove a agregação das CG, proporcionando a manutenção das

interações entre células somáticas-germinativas ou entre células germinativas-matriz extracelular necessários durante a diferenciação e espermatogêneses *in vitro* (STUKENBORG et al, 2008).

Mais recentemente, foram descritos na literatura, trabalhos que induziram a diferenciação *in vitro* de células germinativas (CG) proveniente dos estágios iniciais do desenvolvimento (ASLAM & FISHEL, 1998; TESARIK et al, 1998a, b; TANAKA et al, 2003) ou a partir de espermátides redondas ou alongadas (CREMADES et al, 1999, 2001), mas a espermatogênese completa em sistema 3D desde as SSC até os espermatozóides somente foi evidenciado por Stukenborg et al (2009) e Elhija et al (2011). Nas quais, suspensões celulares derivadas da digestão testicular de camundongos pré-púberes foram cultivados em camada espessa de ágar (SACS), juntamente com presença de gonadotrofinas, hCG e rhFSH, no meio de cultivo, pode-se observar a completa maturação das CG até espermatozóides, após 40 dias de cultivo.

4.5.3.MEIO DE CULTIVO

4.5.3.1.MEIOS DE CULTIVOS BÁSICOS

Existem diversos meios comerciais básicos que podem ser suplementados para o cultivo celular. O meio de cultivo mais utilizado é *Dulbecco modified Eagle Medium* suplementado com *Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12, Gibco®). Sato et al (2011) ao comparar os meios DMEM, DMEM/F12, Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco®) e Alpha Minimum Essencial Medium (α -MEM, Gibco®) observaram que tanto o α -MEM e RPMI suplementados com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) induziram melhor a expressão do GFP do que DMEM/F12 e DMEM em duas linhagens de camundongos transgênicos: Gsg2-GFP (gene conhecido também como Haspin; gene codificador de proteína quinase nuclear específica de CG haplóides; Green Fluorescent Proteins, GFPs, proteína utilizada para o acompanhamento da progressão da espermatogênese através de sua fluorescência) e Acr-GFP (Acrosin; gene codificador de *Acrosin*, maior proteinase presente no acrossomo de espermatozóides).

4.5.3.2.ADIÇÃO DE GONADOTROFINAS (FSH e hCG)

Durante a espermatogênese *in vitro*, além da interação entre células somáticas e germinativas, presença de fatores de crescimento, idade do doador das células testiculares e o tipo de sistema de cultivo, é importante a regulação endócrina. Steinberger et al (1975) relataram que

a adição de hCG estimula a produção de testosterona e o efeito anti-apoptótico nas das CG. Já, Stukenberg et al (2009) relatam que a presença de células de Leydig ativas fornecem testosterona para o sistema de cultivo 3D e o suporte de gonadotrofinas não é necessário para conclusão da meiose, mas é fundamental para a manutenção das colônias de CG masculinas. Ruwasnpura et al (2010) afirma que FSH regula o desenvolvimento das espermatogônias, enquanto a testosterona regula a fase final da espermiogênese e ambos parecem ser igualmente importante para o desenvolvimento dos espermátocitos.

4.5.3.3.SORO FETAL E SUPLEMENTOS

Como citado anteriormente, o uso soro fetal é polêmico, pois acredita-se que o soro pode induzir a diferenciação de algumas células e em outras ele pode conter fatores inibitórios da espermatogênese. Deste modo, Sato et al (2011), na tentativa de superar esta limitação do soro fetal bovino (FBS), substituíram o FBS por soro KnockOut (KSR, Life Technologies) ou por albumina sérica bovina rica em lipídeos (AlbuMAX[®], Life Technologies) - componente mais expressivo presente no KSR – utilizado, geralmente, em meio de cultura de eSC, por promover proliferação e manutenção dessas células em estado indiferenciados. Eles demonstraram que o FBS não possui efeitos inibitórios sobre a espermatogênese e, que a adição de AlbuMAX[®] ao FBS, foi mais efetiva do que somente o AlbuMAX[®].

OBJETIVOS E

HIPÓTESE

5.OBJETIVOS E HIPÓTESE

A intenção deste trabalho é comparar a formação de espermatozóides, a partir de espermatogônias, em diferentes sistemas de cultivo. A seguir são descritas as etapas deste trabalho:

1. Cultivar *in vitro* as células germinativas masculinas até a formação de espermatozóides em cultivo 3D e sistema de cultivo convencional (2D);
2. Caracterizar, através de imunomarcadores, as células desenvolvidas durante a espermatogênese, assim como as células somáticas cocultivadas.

O sistema de cultivo tridimensional parece favorecer estruturalmente a indução da espermatogênese *in vitro*, uma vez parece fornecer um suporte estrutural semelhante encontrado *in vivo*.

CAPÍTULO

Este trabalho deu origem ao artigo "*In vitro* Spermatogenesis of Mice Germ Cell" que foi submetido para publicação no periódico "Fertility and Sterility, exceto a apresentação do idioma.

IN VITRO SPERMATOGENESIS OF MICE GERM CELL

IN VITRO SPERMATOGENESIS OF MICE GERM CELL -

USO DO SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL
PARA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
ESPERMATOGÔNICAS E INDUÇÃO DA
ESPERMATOGÊNESE *IN VITRO*
EM MURINOS

Camila Chavier Macedo¹, B.Sc; Isadora Arruda², B.Sc; Ian Martin³, Ph.D; João Ferreira Lima-
Neto⁴, Ph.D; Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, post Ph.D^{5, a}

^{1,2,3,4,5} Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil;

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processos: 2009/13320-8 e 2010/14930-1

^a Autor para correspondência: Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga
(fernanda@fmvz.unesp.br)

CAPSULE

O objetivo deste experimento foi estudar a indução da espermatogênese *in vitro* em diferentes sistemas de cultivos. O sistema 3D-MCS(+) mostrou-se mais fiel a organização espacial encontrada *in vivo*.

5

10

15

20

OBJECTIVO(S): Comparar diferentes sistemas de cultivo para indução da espermatogênese
25 *in vitro* à partir de SSC.

DESIGN(S): Estudo experimental.

SETTING(S): Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

ANIMAL(S): Camundongos Swiss pré-púberes entre 6-10 dias pós-parto.

30 **INTERVENTION(S):** A progressão da espermatogênese foi avaliada pela expressão de
proteínas marcadoras de espermatogônias (Oct 4; Gfr α -1), espermatócitos (Boule,
Prohibitin), espermátides (Crem, Protamine) e células de Sertoli (SHBG)

MAIN OUTCOME MEASURE(S): Com intuito de avaliar a progressão da meiose *in vitro* e,
conseqüentemente, a produção de células haploides à partir de SSC, foi avaliado a expressão
35 de marcadores específicos das células germinativas em desenvolvimentos, bem como, a
ação de gonadotrofinas (hCG e FSH).

RESULT(S): O sistema de cultivo 3D-MCS parece ser mais vantajosos, uma vez que beneficia
a neoformação de estruturas císticas semelhante a luz dos túbulos seminíferos e resulta em
suspensão celular, o que favorece recuperação das células pós cultivo.

40 **CONCLUSION(S):** Conclui-se que o sistema 3D-MCS-gonadotrofinas(+) parece ser mais
vantajoso por permitir a reorganização das células germinativas após a digestão enzimática.
No entanto, desconhece-se o potencial de fertilização dessas células haplóides, necessitando
outros estudos.

KEY WORDS: Células-tronco espermatogonial (SSC); Cultivo celular bidimensional (2D);
45 Cultivo celular tridimensional (3D); Diferenciação; Espermatogênese.

INTRODUCTION

Os espermatozóides são produzidos pelas espermatogônias, presentes nos testículos, após a puberdade, durante toda a vida, em um processo denominado espermatogênese.

50 Esse processo é altamente coordenado, complexo e contínuo (1). Nas últimas duas décadas, inúmeros trabalhos tentaram induzir a diferenciação *in vitro* de células germinativas (GC; 2; 3,4,5) ou de espermatídes redondas ou alongadas (6,7), mas a espermatogênese completa desde as SSC até os espermatozóides só foi evidenciado por DONG (8), STUKENBORG (9,10); ELHIJA (11) e SATO (12, 13).

55 Utilizando um sistema de cultivo convencional (2D), Dong (8) conseguiram induzir a espermatogênese *in vitro*, onde as SSC isoladas, enriquecidas foram cultivadas sobre uma monocamada de células de Sertoli. Enquanto, Stukenborg (9,10) e Elhija (11) produziram espermatozóides à partir de SSC empregando um sistema de cultivo 3D. Já, Sato (11, 12) produziram espermatozóides ao retomar os estudos iniciais com fragmentos testiculares.

60 No entanto, os sistemas de cultivos e composição dos meios utilizados para induzir a espermatogênese *in vitro* à partir de SSC são diversos por não serem totalmente conhecidos. Desta forma, o objetivo geral deste experimento foi estudar a diferenciação celular e a indução da espermatogênese *in vitro* de SCC oriundas da digestão testicular de camundongos pré-púberes cultivadas em diferentes sistemas: o bidimensional (2D) e

65 tridimensional (3D).

MATERIALS AND METHODS

Para este experimento foram utilizados camundongos Swiss, entre 6-10 dia pós parto (ddp). Nesta fase, esses testículos não possuem qualquer célula meiótica, somente

70 espermatogônias, indiferenciadas e espermatogônias diferenciadas do tipo A, e células de Sertoli. A suspensão testicular foi obtida, como descrita por Stukenborg (9), com algumas modificações. Resumidamente, os animais foram anestesiados através de CO₂ e, posteriormente, eutanasiados por deslocamento cervical. Os testículos foram removidos e colocados em um placa de Petri com solução tampão fosfatada livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (PBS) 75 suplementada com 100IU/ml Penicilina (Gibco®) e 100mg/ml Estreptomicina (Gibco®). Em seguida, os testículos foram decapsulados e colocados em *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS, Gibco®) suplementada com 1mg/ml de colagenase tipo 1A (Life Technologies) e 0,5mg/ml hialuronidase (Sigma®) a 37°C por 30 minutos. Depois da dupla digestão, a suspensão celular foi filtrada em filtros de nylon de 40µm (Millipore®). A eficácia da 80 digestão foi determinada pela concentração celular em Trypan Blue (Gibco®).

Preparo Sistema Cultivo

Para o sistema de cultivo 2D, a suspensão celular, depois de filtrada, foi cultivada sobre placas de 24 poços cobertas por uma fina camada de ágar (0,35%), em alpha-MEM 85 (Gibco®) suplementado com 10% KSR (Gibco®), 2,5ng/ml AlbuMax® (Life echnologies); 10mg/ml solução ITS (BD®) ; 10⁻⁴M Vitamina C (Sigma®); 10mg/ml Vitamina E (Sigma®); 1mM Piruvato (Sigma®); 10⁻³M Testosterona; 100IU/ml Penicilina (Gibco®), 100mg/ml Estreptomicina (Gibco®) e 3µg/ml Anfotericina B (Gibco®). O cultivo foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ a 32°C e o metade do meio trocado semanalmente. Somente na 90 primeira semana, foi adicionado ao meio 3,3x10⁻⁷M Ácido Retinóico e 3,3x10⁻⁷M Retinol (ambos Sigma®).

Enquanto, no sistema de cultivo 3D, as células foram adicionadas ao sistema de cultivo tridimensional *SACS (Soft Agar Culture System)* ou *MCS (Methylcellulose Culture System)*, que consiste em meio espesso de ágar-gel ou metilcelulose 0,35%. Para tanto, foi
95 preparado uma solução de 0,7% ágar (Noble Agar, Difco®) ou metilcelulose (Sigma®, 15cPs) dissolvidos em água de embrião (Gibco®). O ágar e o meio, contendo as células, descrito anteriormente, foram homogenizados a 37°C, evitando assim o estresse térmico e a coagulação prematura do ágar. Em seguida, transferidos para placas com 96 poços e incubados a 32°C em uma atmosfera de 5% CO₂. A cada uma ou duas semanas, o meio era
100 trocado uma vez.

Para cada sistema de cultivo utilizado foram testados dois meios. O *Meio C ou Controle*) – descrito acima e o *Meio G ou Gonadotrofinas*) – composto pelo meio controle acrescido de 5UI/l hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana, Sigma®) e 5UI/l rhFSH (Hormônio folículo estimulante humano recombinante, Sigma®).
105

Imunofluorescência

Aproximadamente, após 50 dias de cultivo, as células de ambos os sistemas foram avaliadas. As células-tronco espermatogoniais foram caracterizadas por OCT 4 e Gfr α -1; os espermátócitos (Boule), espermátides (Crem, Protamine) e células de Sertoli (ABP).
110 Primeiramente, as células cultivadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos e permeabilizadas com Triton X 0,50%-PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. A seguir, o bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado em solução de leite desnatado em pó 3% por 30' também em temperatura ambiente. Os anticorpos (Ac) foram diluídos 1/50 em solução de 5%BSA-PBS: goat anti-Oct3/4 [N-19]; rabbit anti-Gfr α -1 [H-70]; goat anti-

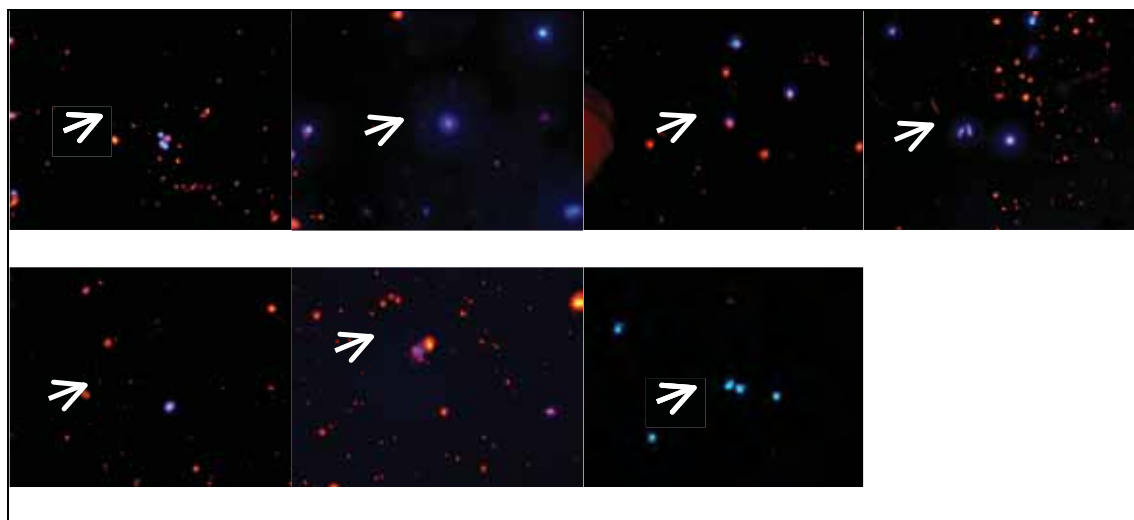
115 Boule [D-12]; rabbit anti-Crem [X-12]; rabbit anti-Protamine1 [M-51]; rabbit anti-SHBG [M-
207] (Todos adquiridos da Santa Cruz Biotechnology) e anti- α -smooth-muscle actin
(Abcam) e incubados overnight a temperatura ambiente. Em seguida, os Ac secundários
foram incubados com Alexa Fluor®555 goat anti-rabbit (1/100), Alexa Fluor®555 rabbit
anti-rabbit (1/100; Life Technologies), donkey anti-goat-FITC (1/30) e donkey anti-rabbit-
120 FITC (1/30; Millipore) por 120' a 37°C. Além disso, também foi utilizada a lectina PSA-FITC
(*Pisum sativum agglutinin*) para avaliar a presença da membrana acrossomal interna. Por
último, os núcleos foram contra corados com DAPI. Em seguida, os poços de ágar foram
fragmentados e colocados sobre laminas, assim como o centrifugado da suspensão celular
oriunda da metilcelulose. As laminas foram montadas com ProLong® Gold Antifade (Life
125 Technologies, USA) e visualizadas com o auxílio de microscópio de fluorescência em
aumento de 400x.

RESULTS

Em ambos os sistemas de cultivo, foi possível a progressão da meiose devido
130 expressão de proteínas marcadoras de espermátides (Protamina), após, aproximadamente,
50 dias de cultivo. Observou-se também expressão de outros genes pré-meióticos (OCT4;
GFR α 1), meióticos (Boule, Crem) e somático (SHBG), ilustrado na Fig.1.

As células germinativas em cultivo se organizavam formando agregados celulares.
No sistema 2D, foram observados colônias celulares, de formado arredondado, com bordos
135 irregulares. No cultivo 3D-MCS, pode-se observar a formação de estruturas císticas que
lembram a luz dos túbulos seminíferos (Fig.2), evidenciando-se uma melhor reorganização
do epitélio seminífero em relação ao cultivo 3D-SACS. Embora tenha ocorrido boa

proliferação celular no sistema 2D, não foi possível observar a formação de estruturas semelhantes as encontradas no cultivo 3D (Fig.3).



140

Figura.1



Figura.2

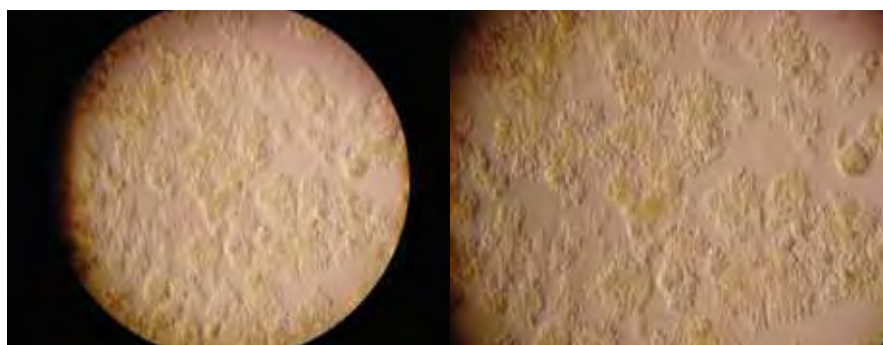


Figura.3

A avaliação da progressão das células germinativas em SACS é muito mais difícil, devido a sua característica ágar-gél e espessura. Apesar das inúmeras inovações tecnológicas que permitam a visualização de imagens em 3D, a melhor maneira de visualizá-las e recuperá-las é através de suspensões celulares pós cultivo (11). Desta forma, a fácil obtenção de suspensão celular pós cultivo pela substituição dessa matriz em ágar por metilcelulose de baixo peso molecular, parece favorecer a reorganização das células testiculares *in vitro* e pode ser facilmente aplicada em técnicas de reprodução assistida.

A adição de gonadotrofinas também parece ter sido benéfica a proliferação celular, uma vez que, na presença destas, formaram-se um maior número de colônias, com maior tamanho. Este efeito foi evidente tanto no sistema 2D quanto nos 3D.

A presença do grânulo acrossomal em espermátides foi avaliada pela marcação de PSA-FITC, sendo observada no sistema 3D-MCS independente da adição de gonadotrofinas, (Fig.1G). Não possível a observação do desenvolvimento do flagelo em nenhum sistema.

DISCUSSION

O presente trabalho relata o sucesso da proliferação celular e retomada da meiose em gonócitos obtidos a partir de testículos de camundongos neonatos cultivados *in vitro* em meio α -MEM suplementado com KSR e Albumax[®].

No testículo fetal a meiose é retardada, até a primeira onda da espermatogênese, devido à inibição da sinalização do ácido retinóico (AR) pela ação da enzima CYP26B1, cuja expressão é regulada pelas células de Sertoli. Quando ocorre a remoção desta enzima ou a adição de AR, reinicia-se a meiose. (14, 15). Li (16) demonstraram que o AR e seus

165 derivados (dAR), são necessários para o início da meiose I durante a primeira onda da
espermatogênese em camundongos pré-púberes. Desta forma, no presente experimento, foi
utilizada a adição de AR e retinol, na primeira semana, sendo estes compostos removidos
durante o restante do cultivo *in vitro*. Este protocolo se mostrou eficiente na promoção da
proliferação celular e indução do início da meiose. Nossos resultados estão de acordo com
170 trabalhos anteriores (8, 17, 18) que conseguiram induzir a espermatogênese *in vitro*, em
diferentes espécies, empregando concentrações semelhantes de AR em ratos, bovinos e
humanos. No entanto, ainda não existe na literatura um consenso sobre a exata
concentração e o tempo de estímulo necessário.

A presença da testosterona é fundamental para a regulação da espermatogênese. De
175 acordo com Lee (17, 18) a concentração de testosterona de 10^{-7} M é suficiente para a
manutenção da espermatogênese *in vitro* em camundongos e humanos. Porém, o uso desta
concentração em experimento piloto realizado previamente a este, não resultou em
mudanças significativas na morfologia das colônias, assim como na expressão de
marcadores de meiose (dados não mostrados). Desta forma optou-se pela utilização de
180 concentrações mais elevadas (10^{-3} M), baseadas nos trabalhos de Sato (11, 12), que
obtiveram sucesso na indução da espermatogênese *in vitro* a partir de fragmentos
testiculares de murinos pré-púberes.

Steinberger (19) relataram que a adição de hCG estimula a produção de testosterona
e estimula o efeito anti-apoptótico nas das CG. Enquanto, Stukenberg (9) relatam que a
185 presença de células de Leydig esteroidogenicamente ativas fornecem testosterona para o
sistema de cultivo 3D e que o suporte de gonadotrofinas não é necessário para conclusão da
meiose, mas é fundamental para a manutenção das colônias de CG masculinas. Ruwanpura

(20) afirma que FSH regula o desenvolvimento das espermatogônias, enquanto a testosterona regula a fase final da espermiogênese e ambos parecem ser igualmente importante para o desenvolvimento dos espermátocitos. Os mecanismos pelas quais as gonadotrofinas atuam na espermatogênese é controverso, porém alguns vias moleculares estão sendo identificadas. No presente trabalho a formação e manutenção de clusteres de espermatogonias foi mais visível nas placas contendo gonadotrofinas, independente do sistema de cultivo, indicando que a adição do hormônio foi benéfica para a evolução da espermatogenese *in vitro*.

Em contraste com o sistema convencional de cultivo, onde a placa é coberta por uma fina camada de gelatina, matrigel, ou outra substância (sistema 2D), o sistema 3D cria uma camada mais espessa, (com vários milímetros ou até centímetros), na qual as células ficam embebidas (8). Sendo assim, o sistema 3D promove a criação de um microambiente que mimetiza as condições espaciais as quais as células estão sujeitas *in vivo*, promovendo a formação de clusters tridimensionais de células germinativas e criando contatos celulares potencialmente importantes para a diferenciação celular (9). No presente experimento, embora a proliferação celular tenha sido observada em ambos os sistemas, no cultivo 3D observou-se a formação, não só dos cluster celulares, mas de estruturas císticas em seu interior, mimetizando possivelmente a organização do túbulo seminífero com sua luz.

Diferente do sistema 3D-SACS utilizado por Elhija (11) e por nós, o sistema 3D-MCS é uma alternativa que poderá ser mais facilmente utilizada em técnicas de reprodução assistida. Este sistema de cultivo, além de permitir que as células se organizem, por possuir característica mais viscosa do meio em relação ao ágar-gel, mantém as células em suspensão, o que favorece a recuperação destas e a caracterização pós cultivo.

Alem disso, aparentemente o sistema 3D-SACS também se mostrou superior ao 2D-MCS, uma vez que somente utilizando-se esta metodologia de cultivo, foi possível observar a presença do granulo acrossomal através da expressão da lectina PSA conjugada com FITC. Resultado semelhante foi obtido por Elhija (11). No entanto, a marcação verde amarelado
215 evidenciada em ambos os trabalhos demonstra que é necessário melhorias na qualidade do cultivo, uma vez que a lectina PNA e PSA é uma coloração de exclusão e sua expressão revela que estes acrossomos podem estar danificados.

Inúmeras razões podem explicar a falha na detecção de espermatozóides, dentre elas pode-se incluir a dificuldade de visualização microscópica devido a espessura do ágar-gel e
220 da metilcelulose, ou a produção de um número muito pequeno de espermatozóides por poço, o que dificultaria sua visualização mesmo fazendo uso do contraste de Hoffman (9, 11).

De acordo com os resultados obtidos neste experimento o sistema de cultivo 3D-MCS com adição de gonadotrofinas é o mais eficiente para a promoção da espermatogenese in
225 vitro a partir de células germinativas primordiais obtidas de camundongos neonatos. Este sistema beneficiou a formação de clusters de espermatogônias, bem como a formação de estruturas císticas semelhante a luz dos túbulos seminíferos, além de manter as células em suspensão celular, o que favorece sua recuperação e caracterização após o cultivo. No entanto, o potencial de fertilização dessas espermátides redondas e em alongamento é
230 desconhecido, necessitando de novos experimentos.

ACKNOWLEDGMENTS

235 Os autores deste trabalho agradecem a FAPESP pelo financiamento do projeto, de
bolsas de mestrado e de treinamento técnico. Assim como, a Ana Lúcia Garippo, bióloga e
técnica do Núcleo de Microscopia Confocal da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo,
Brasil); Jan-Bernd Stukenborg, pesquisador da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do
Instituto de Karolinska (Estocolmo, Suécia) e Maria de Fátima Gartner, professora de
240 patologia veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), da
Universidade do Porto (Porto, Portugal) pelo compartilhamento de experiências e
protocolos de imunomarcção.

REFERENCES

- 245 (1) Sharpe, R. Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction*, ed. E Knobil. *JD Neill*, 1:1363–434. New York: Raven. 1994.
- (2) ASLAM I.; FISHEL, S. Short-term in vitro culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human in vitro conception. *Hum Reprod* 1998; 13:634–638.
- 250 (3) Tesarik, J.; Greco, E.; Rienzi, L.; Ubaldi, F.; Guido, M.; Cohen-Bacrie, P.; Mendoza, C. Differentiation of spermatogenic cells during in-vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia effect of recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*. 1998; 13:2772–2781.
- 255 (4) Tesarik, J; Guido, M; Mendoza, C.; Greco, E. Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:4467–4473.
- 260 (5) Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, Mawatari Y, Tanaka I, Kusunoki H Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. *Fertil Steril*. 2003; 79:795–801.
- (6) Cremades N, Bernabeu R, Barros A, Sousa M. In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. *Hum Reprod* 1999; 14:1287–1293.
- 265 (7) Cremades N, Sousa M, Bernabeu R, Barros A. Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum Reprod* 2001; 16:1938–1944.
- 270 (8) Dong, W.-Z.; Hua, J.-L.; Shen, W.-Z.; Dou, Z.-Y. *In vitro* production of haploid sperm cells from male germ cells of foetal cattle. *Ani. Repr. Sci*. 2010; 118 (2-4): 103-9.
- 275 (9) Stukenborg, JB; Wistuba, J; Luetjens, CM; Elhija, MA; Huleihel, M; Lunenfeld, E; Gromoll, J; Nieschlag, E; Schlatt, S. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. *J Androl*. 2008; 29:312–329.
- 280 (10) Stukenborg, JB; Schlatt, S; Simoni, M; Yeung, C-Y.; Elhija, MA; Luetjens, CM; Huleihel, M; Wistuba, J. New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol. Hum, Repr*. 2009; 5(9): 521-29.
- (11) Elhija Ma; Lunenfeld E; Schlatt S; Huleihel M Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in soft agar culture system. *Journal of Andrology*, In Press, DOI:10.1038/aja.2011.112
- 285

- (12)Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471 (7339):504-7.
- 290 (13) Sato T; Katagiri K, Yokonishi T; Kubota Y; Inoue K; Ogonuki N; Matoba S; Ogura A; Ogawa T *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nature Communications* (2011).2.Article number: 472
- 295 (14)Maclean, G.; Li, H.; Metzger, D.; Chambon, P.; Petkovich, M Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology*. 2007; 148: 4560–4567.
- (15)Mclaren, A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 2003; 262:1–15.
- 300 (16)Li,H; Palczewski, K; Baehr, W; Clagett-Dame, M. Vitamin A Deficiency Results in Meiotic Failure and Accumulation of Undifferentiated Spermatogonia in Prepubertal Mouse Testis. *Biology of Reproduction* 2011; 84, 336–341.
- 305 (17)Lee, J.H.; Kim, H. J.; Kim, H; Lee, S. J.; Gye, M. C. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials*. 2006; 27:2845-2853.
- 310 (18)Lee, J.H.; Gye, M.C.; Choi, K.W.; Hong, J.Y.; Lee, Y.B.; Et Al. In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril*. 87: 824–833. 2007.
- (19)Steinberger, A. Studies on spermatogenesis and steroidogenesis in culture. *Am Zool*. 1975; 15: 273–278.
- 315 (20)RUWANPURA, SM; Mclachlan RI; Meachem SJ Hormonal regulation of male germ cell development. *Journal of Endocrinology* 2010; 205, 117–131.

320

325

FIGURE LEGENDS

Figura.1: Expressão dos marcadores (na sequencia, esquerda para direita e de cima para baixo): OCT4; GFR α 1; Boule; Crem; Protamina; SHBG conjugados com AlexaFluor[®] 555 e o último o PSA-FITC. Aumento de 400x.

330

Figura.2: Formação de estruturas císticas semelhantes à luz dos túbulos seminíferos no sistema de cultivo 3D-MCS. Aumento de 400x e 100x.

Figura.3: Formação dos clusteres no sistema de cultivo 2D. Aumento 50x e 100x.

335

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Embora a espermatogênese *in vitro* de mamíferos tenha um longo histórico de pesquisa, não há uma padronização da técnica e muitos aspectos ainda permanecem indefinidos, pois pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e bioquímicos desse processo.

O sistema 3D-MCS(+) mostrou-se mais fiel a organização espacial encontrada *in vivo*. No entanto, o potencial de fertilização dessas espermátides redondas e em alongamento é desconhecido, necessitando de novos experimentos.

***REFERÊNCIAS DA
INTRODUÇÃO***

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. Tecidos especializados, Células-Tronco e Renovação de Tecidos. In *Biologia molecular da Célular*. 5 ed. Porto Alegre, ArtMed, 2010.
- ALLARD, E.K.; BLANCHARD, K. T.; BOEKELHEIDE, K. Exogenous stem cell factor (SCF) compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5-hexanedione-induced testicular atrophy in rats. *Biol Reprod.* v55, p185–193., 1996.
- ASLAM I.; FISHEL, S. Short-term in vitro culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human in vitro conception. *Hum Reprod.* 13, p634–638, 1998.
- APONTE, P. M.; VAN BRAGT, M. P.; DE ROOIJ, D. G.; VAN PELT, A. M. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica.* 113, p727–742., 2005.
- BARROCA, V; BRUNO LASSALLE, B; COUREUIL; M; LOUIS, JP, LE PAGE, F; TESTART, J; ALLEMAND, I; LYDIA RIOU, L; FOUCHET, P. Nature Letter (2008). DOI: 10.1038/ncb1826
- BELLVÉ, A. R.; CAVICCHIA, J. C.; MILLETTE, C. F.; O'BRIEN, D. A.; BHATNAGAR, Y. M.; DYM, M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* 74, p68–85. 1977.
- BLANCHARD, K. T.; LEE, J.; BOEKELHEIDE, K. Leuprolide, a gonadotropin releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression. *Endocrinology*, 139, p236–244, 1998.
- CHAMPY, C. Quelques re'sultats de la me'thode de culture des tissus. *Arch Zool Exp Gen.*, 60, p461–500, 1920.
- CHANG, H.Y.; CHI, J.T.; DUDOIT, S., BONDRE, C., VAN DE RIJN, M., BOTSTEIN, D., AND BROWN, P. O. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*, 99, p12877–12882, 2002.
- CLERMONT, Y. Quantative analyses of spermatogenesis of the rat: a revised model for renewal of spermatogonia. *Am J Anat.* 111, p111–29, 1962.
- CLERMONT, Y.; OKO, R.; HERMO, L. Cell biology of mammalian spermiogenesis. In *Cell and Molecular Biology of the Testis*, ed. C Desjardins, LL Ewing. *Oxford Univ. Press.* 1, p332–76, 1993.
- CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.*, 100, p241–67, 1957.

CREEMERS, L. B.; DEN OUDEN, K.; VAN PELT, A. M. M.; DE ROOIJ, D. G. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reprod.* 124, p791-99, 2002.

CREMADES N, BERNABEU R, BARROS A, SOUSA M. In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. *Hum Reprod* 14, p1287 – 1293, 1999.

CREMADES N, SOUSA M, BERNABEU R, BARROS A. Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum Reprod.*; 16, p1938–1944, 2001.

DE ROOIJ, D. G. Stem cell in testis. *Int J Exp Pathol.* 79, p67-80, 1998.

DE ROOIJ, D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cell. *Reprod.* 121, p347-354, 2001.

DE ROOIJ, D. G. The Spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech.* v7, n8, p580-5, 2009.

DE ROOIJ, D. G.; GROOTEGOED, J. A. Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, p694–701, 1998.

DE ROOIJ, D. G.; RUSSEL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Andrology.* 21, p776-798., 2000.

DE MIGUEL, M. P.; DE BOER-BROUWER, M.; PANIAGUA, R.; VAN DEN HURK, R.; DE ROOIJ, D. G.; VAN DISSEL-EMILIANI, F. M. F. Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in a coculture system. *Endocrinology.* 137, p1885–1893, 1996.

DIRAMI G, RAVINDRANATH N, PURSEL V, DYM M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biol Reprod.* 61, p225–230, 1999.

DONG, W.-Z.; HUA, J.-L.; SHEN, W.-Z.; DOU, Z.-Y. *In vitro* production of haploid sperm cells from male germ cells of foetal cattle. *Ani. Repro. Sci.* v118, n 2-4, p103-9, 2010.

ELHIJA MA; LUNENFELD E; SCHLATT S; HULEIHEL M Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in soft agar culture system. *Journal of Andrology*, In Press, DOI:10.1038/aja.2011.112

FENG LX, CHEN Y, DETTIN L, REIJO-PERA RA, HERR JC, GOLDBERG E, DYM M. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 297, p392–395, 2002.

FUJITA, K.; TSUJIMURA, A.; TAKAO, T.; MIYAGAWA, Y.; MATSUMIYA, K.; KOGA, M.; TAKEYAMA, M.; FUJIOKA, H.; AOZASA, K.; OKUYAMA, A., 2005. Expression of inhibin a, glia cell line-derived neurotrophic factor in Sertoli cell only syndrome: relation to

successful sperm retrieval by microdis- section testicular sperm extraction. *Hum Reprod.* v20, n8, p2289–2294, 2005.

GOLDSCHMIDT, R. Some experiments on spermatogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1, p220–222, 1915.

GUAN, K.; NAYERNIA, K.; MAIER, L.S.; WAGNER, S.; DRESSEL, R.; LEE, J.H.; NOLTE, J.; WOLF, F.; LI, M.; ENGEL, W.; HASENFUSS, G. Pluripotency of spermatogonial stem cell from adult mouse testis. *Nature.* 440, p1199–1203., 2006.

HAMRA, F.K.; CHAPMAN, K.M.; WU, Z.; GARBERS, D.L. Isolating Highly Pure Rat Spermatogonial Stem Cells in Culture. *Methods in Molecular Biology.* 450, p163-179, 2008.

HASTHORPE S. Clonogenic culture of normal spermatogonia: in vitro regulation of postnatal germ cell proliferation. *Biol Reprod.* 68, p1354–1360, 2003.

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169, p533–557, 1971.

HUCKINS, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* 190, p905–26, 1978.

HUCKINS, C.; CLERMONT, Y. Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 51, p341–54, 1968.

IZADYAR, F.; DEN OUDEN, K.; CREEMERS, L. B.; POSTHUMA, G.; PARVINEN, M.; DE ROOIJ, D. G. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol. Reprod.* 68, p272-281, 2003.

KANATSU-SHINOHARA, M.; OGONUKI, N.; INOUE, K.; MIKI, H.; OGURA, A.; TOYOKUNI, S.; SHINOHARA, T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69, p612–616, 2003.

KANATSU-SHINOHARA, M.; INOUE, K.; LEE, J.; YOSHIMOTO, M.; OGONOKI, N.; MIKI, H.; BABA, S.; KATO, T.; KAZUKI, Y.; TOYOKUNI, S.; TOYOSHIMA, M.; OHTSURA, N.; OSHIMURA, M.; HEIKE, T.; NAKAHATA, T.; ISHINO, F.; OGURA, A.; SHINOHARA, T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell.* 119, p1001–1012, 2004.

KANATSU-SHINOHARA M, MIKI H, INOUE K, OGONUKI N, TOYOKUNI S, OGURA A, SHINOHARA T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod.* 72, p985–991, 2005a.

KANATSU-SHINOHARA M, OGONUKI N, IWANO T, LEE J, KAZUKI Y, INOUE K, MIKI H, TAKEHASHI M, TOYOKUNI S, SHINKAI Y, OSHIMURA M, ISHINO F, OGURA A, SHINOHARA T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development.* 132, p4155–4163, 2005b.

KOH K.B.; KOMIYAMA, M.; TOYAMA, Y.; ADACHI, T.; MORI, C. Percoll fractionation of adult mouse spermatogonia improves germ cell transplantation. *Asian J Androl.* 6, p93–98, 2004.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 71, p722–31. 2004a.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *PNAS.* 10, p16489–16494, 2004b.

KUBOTA, H.; BRINSTER, R. L. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of postnatal animal. *Methods Cell Biol.* 86, p59–84, 2008.

LEE, J.; RICHBURG, J. H.; YOUNKIN, S. C.; BOEKELHEIDE, K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology.* 138, p2081–2088, 1997.

LEE, J.H.; KIM, H. J.; KIM, H; LEE, S. J.; GYE, M. C. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials.* 27, p2845–2853, 2006.

LEE, J.H.; GYE, M.C.; CHOI, K.W.; HONG, J.Y.; LEE, Y.B.; ET AL. In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril.* 87, p824–833, 2007.

MACLEAN, G.; LI, H.; METZGER, D.; CHAMBON, P.; PETKOVICH, M., 2007. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology.* 148, 4560–4567, 2007.

MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262, p1–15, 2003.

MCLEAN, D.J.; FRIEL, P.J.; JOHNSTON, D.S.; GRISWOLD, M.D. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol Reprod.* 69, p2085–2091, 2003.

MENG, X.; LINDAHL, M.; HYVO"NNEN, M.E.; PARVINEN, M.; DE ROOIJ, D.G.; ET AL., 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 287, 1489–1493, 2000.

MICHAJLOW, M. Experimentell-histologische untersuchungen u"ber dieelemente der hodenkan"lchen. *Z Zellforsch.* 26, p174–201, 1937.

MIEUSSET, R.; BUJAN, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 18, p169–184, 1995.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN E.M.B. Células-tronco: o que são e o que serão? *Rev. Genética na Escola*, p. 12–15, 2006

- NAKAMURA M, ROMRELL LJ, HALL PF. The effects of temperature and glucose on protein biosynthesis by immature (round) spermatids from rat testes. *J Cell Biol* 79; p1–9; 1978.
- NAGANO, M.; BRINSTER R.L. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *APMIS*, 106, p47–55, 1998.
- NAGANO, R.; TABATA S.; NAKANISHI, Y.; OHSAKO, S.; KUROHMARU, M.; HAYASHI, Y. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec*, 258, p210–220, 2000.
- NAGANO, M.; RYU, B.Y.; BRINSTER, C.J.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod*. 68, p2207–2214, 2003.
- NAYERNIA, K.; Li, M.; ENGEL, W. Spermatogonial Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*. 253, p105–120, 2004.
- OAKBERG, E. F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat.Rec.* 169, p515–531, 1971
- RYU, B.-Y., et al. Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. *Dev. Biol.*, 263, p.253–263, 2003.
- RUWANPURA, SM; McLACHLAN RI; MEACHEM SJ Hormonal regulation of male germ cell development. *Journal of Endocrinology* 205, p117–131, 2010.
- SAPSFORD, C. S. Changes in the cells of the sex cords and the seminiferous tubules during development of the testis of the rat and the mouse. *Austr. J. Zool.* 101, p178–92, 1962
- SATO T, KATAGIRI K, GOHARA A, INOUE K, OGONUKI N, OGURA A, KUBOTA Y, OGAWA T. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471(7339), p504–7, 2011.
- SATO T; KATAGIRI K, YOKONISHI T; KUBOTA Y; INOUE K; OGONUKI N; MATOBA S; OGURA A; OGAWA T *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nature Communications* (2011).2.Article number: 472,
- SCADDEN, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, p1075–79., 2006.
- SHINOHARA, T.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. β_1^- and α_6^- integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *PNAS*. 96, 5504–5509, 1999.
- SHINOHARA, T.; ORWIG, K. E.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *PNAS*. 97, 8346–8351, 2000.

SHINOHARA, T., et al. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *PNAS*, .98, p.6186–6191, 2001

SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* 414, p98–104. 2001.

STAUB, C. A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation in vitro. *J Androl* 22, p911–926, 2001.

STEINBERGER, A. Studies on spermatogenesis and steroidogenesis in culture. *Am Zool.* 15, p273–278, 1975.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. In vitro culture of rat testicular cells. *Exp CellRes.* 44, 443–452, 1966.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Tissue culture of male mammalian gonads. *In Vitro.* 5, p17–27, 1970.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E.; PERLOFF, W.H., 1964. Mammalian testes in organ culture. *Exp Cell Res* 36, p19–27. 1964.

STERN, H. The process of meiosis. In *Cell and Molecular Biology of the Testis*, ed. C Desjardins, LL Ewing. 1, p296–331. *Oxford Univ. Press*, 1993.

STUKENBORG, J.B.; WISTUBA, J.; LUETJENS, C.M.; ELHIJA, M.A.; HULEIHEL, M.; LUNENFELD, E.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E.; SCHLATT, S. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. *J Androl.* 29, p312–329, 2008.

STUKENBORG, J. B.; SCHLATT, S.; SIMONI, M.; YEUNG, C.-Y.; ELHIJA, M. A.; LUETJENS, C. M.; HULEIHEL, M.; WISTUBA, J. New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and pos-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol. Hum, Repro.* v5, n9, p521-29, 2009.

TANAKA A, NAGAYOSHI M, AWATA S, MAWATARI Y, TANAKA I, KUSUNOKI H Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. *Fertil Steril.* 79, p795–801, 2003.

TESARIK, J.; GRECO, E.; RIENZI, L.; UBALDI, F.; GUIDO, M.; COHEN-BACRIE, P.; MENDOZA, C. Differentiation of spermatogenic cells during in-vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia effect of recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 13, p2772–2781, 1998a.

TESARIK, J.; GUIDO, M.; MENDOZA, C.; GRECO, E. Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, p4467–4473, 1998b.

VAN PELT A.M.M; MORENA, A.R.; VAN DISSEL-EMILIANI, F.M.F.; BOITANI, C.; GAEMERS, I.C.; DE ROOIJ, D.G.; STEFANINI, M. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biology of Reproduction*. 55, p439–444, 1996.

VERGOUWEN, R.P.; HUIKAMP, R.; BAS, R.J.; ROEPERS-GAJADIEN, H.L.; DAVIDS, J.A.; DE ROOIJ, D.G. Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fertil*. 99, p479–485, 1993.

VON SCHÖNFELDT, V.; KRISHNAMURTHY, H.; FOPPIANI, L.; SCHLATT, S. Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. *Biol. Reprod*. 61, p582-589, 1999.

WISTUBA J, STUKENBORG JB, LUETJENS CM. Mammalian Spermatogenesis. *Funct Dev*. 1:p99–117, 2007.

ZAGOS, MA; COVAS, DM Células-Tronco. A Nova Fornteira da Medicina. Ed. Atheneu. 1 ed, 2006

ZHANG, S. Beyond the petri dish. *Nat. Biotechnol*. 22, p.151-2, 2004.