ROBINSON ANDRÉ WORST

Preservação da linhagem germinativa em machos murinos

São Paulo

2016

ROBINSON ANDRÉ WORST

Preservação da linhagem germinativa em machos murinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Visintin

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3433
FMVZ

Worst, Robinson André

Preservação da linhagem germinativa em machos murinos / Robinson André Worst.
-- 2016.
53f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin.

1. Biotecnologias da reprodução. 2. Célula-tronco. 3. Criopreservação.
4. Transplante. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 27 de agosto de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Preservação da linhagem germinativa em machos murinos", protocolado sob o CEUA nº 1943300614, utilizando 240 Camundongos isogênicos (240 machos), sob a responsabilidade de José Antonio Visintin, foi aprovado na reunião de 27/08/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Preservation of murine male germline", protocol number CEUA 1943300614, utilizing 240 Isogenics mice (240 males), under the responsibility José Antonio Visintin, was approved in the meeting of day 08/27/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 07 de janeiro de 2016
CEUA N 1943300614

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: José Antonio Visintin
Área: Reprodução Animal
José Antonio Visintin (orientador)

Título do projeto: "Preservação da linhagem germinativa em machos murinos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 07/janeiro/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Após a qualificação foi sugerido o uso de camundongos GFP para diminuir o uso de camundongos selvagens e facilitar a análise posterior. Em anexo está o projeto de pesquisa atualizado quanto ao uso dos animais GFP e também os documentos que comprovam a compra dos animais, a autorização da CIBio da FMVZ e da CIBio do ICB, pois os animais são originários do Biotério Central de Camundongos Transgênicos. Também em anexo está o certificado do estágio realizado nesse biotério para capacitar o aluno na criação e manejo com esses animais."

Comentário da CEUA: "Tendo-se em vista a relação dos documentos apresentados em vista da sugestão de inclusão de novos animais, aprove-se a presente emenda."

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: WORST, Robinson André

Título: Preservação da linhagem germinativa em machos murinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorem Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A Deus.

Ao meu pai Wilson e a minha mãe Valdemira.

À minha esposa Patrícia e à minha bebê Iasmin.

*“Disse a flor para
o pequeno príncipe:
É preciso que eu suporte
duas ou três larvas
se quiser conhecer as borboletas.”*
Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa que chega ao fim. Depois de todo esse tempo convivendo com pessoas tão queridas, sinceras e amigas é difícil expressar em poucas palavras a importância que cada um teve, mas vamos lá...

Aos meus orientadores! O titular, Prof. Visintin, e sua suplente, mas não menos importante, Profa. Mayra. Obrigado por mais uma oportunidade! Vocês podem estar um pouco desapontados em relação a alguns aspectos, mas garanto que ajudaram a formar um profissional que poderá contribuir para a sociedade.

Obrigado Camilla por sempre estar próxima, me auxiliando e cobrando para que esta tese saísse.

Obrigado aos Pós-doutorandos, Marcelo (Febém) e Thaís! Obrigado pelo tempo dedicado a mim. Espero ainda o fazer valer a pena...

Aos colegas que passaram pelo mestrado e doutorado no laboratório nesse período: Mariana, Adriano, Letícia, Luana, Juliana e Patrícia. E aos novos agregados: Ignácio, Tamie e Vivian.

Obrigado à família do VRA! Muito obrigado pelo convívio, amizade e ensinamentos de todos os professores, colegas e funcionários.

Muito obrigado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Universidade de São Paulo pela ótima estrutura disponibilizada!

Muito obrigado à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos.

Também não posso deixar de agradecer ao Instituto Lab System de Pesquisas e Ensaios que me deu a oportunidade de aplicar meu conhecimento sobre a Ciência de Animais de Laboratório e a me proporcionar o convívio em um ambiente que estimula nosso desenvolvimento. Espero continuar contribuindo com vocês.

Aos membros titulares da banca, professores Ricardo Pereira e Marcílio Nichi, ao Dr. Daniel Zylbersztejn e Dra. Mariana Giassetti. Aos membros suplentes: Profa. Mayra, Prof. Mário, Camilla Mota, Thaís Hamilton e Marcelo Goissis. Obrigado a todos por disponibilizarem seu tempo e colaborar com comentários e correções deste trabalho. Muito obrigado!

E por último, agradecer a minha família, minha mãe que me acompanha lá de cima, meu pai, minha madrastra Tereza, por cuidar do meu pai, tios... A todos por acreditarem em mim e cuidaram uns dos outros no meu momento de minha ausência.

Obrigado a minha esposa por ter me dado a maior graça que um homem pode receber que é a oportunidade de ser pai. Obrigado por cuidar da nossa filha! À minha linda bebê que, embora não tenha compreensão, és minha maior prenda! Contigo meus dias são mais felizes.

Ah Sim! Ao meu time do coração! Grêmio Football Porto Alegre, pelas fortes emoções proporcionadas, especialmente este ano. Agora eu e tu podemos dizer: Somos Campeões!

RESUMO

WORST, R. A. **Preservação da linhagem germinativa em machos murinos.** [Preservation of murine male germline]. 2016. 53 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Ao longo da vida reprodutiva dos machos, espermatozoides são formados pelas células-tronco espermatogoniais (SSCs, do inglês *spermatogonial stem cells*) por um processo conhecido como espermatogênese. O cultivo *in vitro* de SSCs abriu novas possibilidades para a preservação da linhagem germinativa, porém os protocolos requerem a adição de fatores de crescimento e exige a manutenção dessas células por um tempo prolongado, fazendo da criopreservação de SSCs uma alternativa para esse problema. A literatura científica ainda não definiu uma metodologia que seja eficaz na congelação das SSCs. O presente estudo teve por objetivo avaliar duas metodologias de vitrificação de tecido testicular de murinos. Para testar esse objetivo, testículos de camundongos da linhagem C57BL6 GFP+ com 8 a 10 dias de idade foram submetidos a dois protocolos de vitrificação de tecido testicular descritos na literatura (Protocolo EG+Sacarose e Protocolo EG+DMSO+BSA). Após 4 a 12 semanas, os testículos vitrificados foram descongelados e as células testiculares dissociadas para avaliação da viabilidade e concentração. As SSCs foram selecionadas por meio de separação celular por “beads” magnéticas (MACS) com anticorpo Thy1.2 e transplantadas para testículos de camundongos adultos da linhagem C57BL6 previamente tratados com o quimioterápico busulfan. Após seis semanas, os testículos destes animais foram coletados e os túbulos seminíferos dissociados para avaliação da formação de colônias pelas SSCs transplantadas. Houve diferença estatística ($p < 0,0001$) na viabilidade das células entre o Protocolo EG+Sac e Protocolo EG+DMSO+BSA, sendo de 74,4% e 82,8%, respectivamente. Também houve diferença estatística ($p < 0,0001$) na concentração de células obtidas entre o Protocolo EG+Sac e Protocolo EG+DMSO+BSA, sendo de $0,43 \times 10^6$ e $1,35 \times 10^6$, respectivamente. Colônias formadas pelas SSCs transplantadas foram encontradas nos testículos dos animais transplantados para os dois protocolos de vitrificação. De forma descritiva, podemos relatar que o número de colônias observadas para as células do Protocolo EG+DMSO+BSA foi maior comparado ao Protocolo EG+Sac. Portanto, conclui-se que os protocolos de vitrificação de tecido testicular de camundongos estudados foram capazes de preservar a viabilidade de células-tronco espermatogoniais possibilitando a formação de colônias por estas, sendo que o Protocolo EG+DMSO+BSA de vitrificação foi mais eficiente.

Palavras-chave: Biotecnologias da reprodução. Célula-tronco. Criopreservação. Transplante.

ABSTRACT

WORST, R. A. **Preservation of murine male germline**. [Preservação da linhagem germinativa em machos murinos]. 2016. 53 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Throughout the reproductive life of males, spermatozoa are formed by spermatogonial stem cells (SSCs) by a process known as spermatogenesis. The *in vitro* culture of SSCs created new possibilities for preservation of the germ line, but the protocols require the addition of growth factors and require the maintenance of these cells for a prolonged time, making of the SSCs cryopreservation an alternative for this problem. The scientific literature has not yet defined a methodology that is effective in the freezing of SSCs. The present study aimed to evaluate two methodologies of vitrification of murine testicular tissue. To test this aim, testes of mice of the C57BL6 GFP + strain with 8 to 10 days old were submitted to two protocols of testicular tissue vitrification (Protocol EG+Sucrose and EG+DMSO+BSA). After 4 to 12 weeks, the vitrified testes were thawed and the testicular cells dissociated for viability and concentration assessment. The SSCs were selected by magnetic-activated cell sorting (MACS) using Thy1.2 antibody and transplanted to testes of adult mice of the C57BL6 strain previously treated with the chemotherapeutic busulfan. After six weeks, the testes of these animals were collected and seminiferous tubules dissociated to evaluate the formation of colonies by transplanted SSCs. There was a statistical difference ($p < 0.0001$) in cell viability between Protocol EG+Suc and Protocol EG+DMSO+BSA, being 74.4% and 82.8%, respectively. There was also a statistical difference ($p < 0.0001$) in the concentration of cells obtained between Protocol EG+Suc and Protocol EG+DMSO+BSA, being 0.43×10^6 and 1.35×10^6 , respectively. Colonies formed by the transplanted SSCs were found in the testes of the transplanted animals for the two vitrification protocols. In a descriptive way, we can report that the number of colonies observed for Protocol EG+DMSO+BSA cells was higher compared to the Protocol EG+Suc. Therefore, it is concluded that the mice testicular tissue vitrification protocols studied were able to preserve the viability of spermatogonial stem cells allowing the formation of colonies by these cells and the vitrification Protocol EG+DMSO+BSA was more efficient.

Keywords: Reproduction biotechnology. Stem cell. Cryopreservation. Transplantation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1-4	Célula-tronco espermatogonial do tipo A (1-4)
Aal	Célula-tronco espermatogonial do tipo A alinhada
Aescura	Célula-tronco espermatogonial do tipo A escura
Apálida	Célula-tronco espermatogonial do tipo A pálida
Apr	Célula-tronco espermatogonial do tipo A pareada
As	Célula-tronco espermatogonial do tipo A simples
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico, do inglês <i>basicFibroblastGrowthFactor</i>
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>BovineSerumAlbumin</i>
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>DeoxyribonucleicAcid</i>
DNAseI	Desoxirribonuclease tipo I
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	Etilenoglicol
FACS	Separação celular ativada por fluorescência, do inglês <i>Fluorescence-ActivatedCellSorting</i>
FCS	Soro fetal bovino, do inglês <i>Fetal CalfSerum</i>
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia, do inglês <i>Glialcellline-DerivedNeurotrophicFactor</i>
GFP	Proteína verde-fluorescente, do inglês <i>Green FluorescentProtein</i>
HSA	Albumina sérica humana, do inglês <i>HumanSerumAlbumin</i>
ISCI	Injeção de espermatozoides intra-citoplasmática, do inglês <i>IntracytoplasmicSpermInjection</i>
MACS	Separação celular ativada magneticamente, do inglês <i>Magnetic-ActivatedCellSorting</i>
MEF	Fibroblastos fetais murinos mitoticamente inativados, do inglês <i>Mouse EmbryonicFibroblasts</i>
MEM	MinimumEssential Media
PBS	Solução salina fosfatada, do inglês <i>PhosphateBufferedSaline</i>
PGCs	Células germinativas primordiais, do inglês <i>Primordial GermCells</i>
SCF	Fator de célula-tronco, do inglês <i>StemCellFactor</i>
SSC	Célula-tronco espermatogoniais, do inglês <i>SpermatogonialStemCell</i>
SSCs	Células-tronco espermatogoniais, do inglês <i>SpermatogonialStemCells</i>
Thy1.2	Thy 1.2 ou CD90 1.2 (gene)
W/W	Homozigose dominante para o locus gênico <i>whitespotting</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
	2.1 ENTENDENDO O QUE É UMA SSC	15
	2.2 PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE NA ESPÉCIE HUMANA	17
	2.3 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DE SSCs.....	18
	2.4 CULTIVO IN VITRO X CRIOPRESERVAÇÃO	19
	2.5 TRANSPLANTE DE SSCs	21
3	HIPÓTESE	23
4	OBJETIVOS	24
	4.1 OBJETIVO GERAL	24
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5	MATERIAL E MÉTODO	25
	5.1 ANIMAIS	25
	5.2 COLETA E PREPARO DOS TESTÍCULOS	25
	5.3 VITRIFICAÇÃO DE TESTÍCULOS COM PERFURAÇÃO DA TÚNICA ALBUGÍNEA	26
	5.4 VITRIFICAÇÃO DE TESTÍCULOS COM SECÇÃO AO MEIO	27
	5.5 DELINEAMENTO NAS ETAPAS SEGUINTE.....	27
	5.6 DESCONGELAÇÃO DOS TESTÍCULOS.....	28
	5.7 DIGESTÃO DOS FRAGMENTOS DE TESTÍCULOS.....	29
	5.8 SELEÇÃO DE SSCs POR MEIO DE MACS.....	30
	5.9 TRANSPLANTE DE SSCs PARA CAMUNDONGOS RECEPTORES	31
	5.10 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE SSCs.....	31
	5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
	6.1 PROTOCOLOS PARA VITRIFICAÇÃO DE TESTÍCULO.....	33
	6.2 DESCONGELAÇÃO E OBTENÇÃO DE CÉLULAS TESTICULARES DOS TESTÍCULOS/FRAGMENTOS VITRIFICADOS	34

6.3 SELEÇÃO DE SSCs POR MACS	38
6.4 TRANSPLANTE DAS SSCs E AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	39
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICES.....	49

1 INTRODUÇÃO

Células-tronco espermatogoniais (SSC, do inglês *spermatogonialstemcell*) é o termo utilizado para denominar células germinativas diploides relativamente indiferenciadas presentes no epitélio seminífero, as quais são capazes de realizar divisões mitóticas originando ao final espermatócitos primários (DE ROOIJ; RUSSEL, 2000).

Os efeitos deletérios da quimioterapia sobre as SSCs em pacientes com câncer estão muito bem descritos (HOWELL; SHALET, 2001; LASS *et al.*, 2001). Para homens em idade reprodutiva que serão submetidos à quimioterapia e que tem interesse em ter filhos futuramente, existe a possibilidade de congelamento de sêmen e posterior injeção de espermatozoides em oócitos. No entanto, para meninos pré-púberes a alternativa mais estudada é o isolamento de células-tronco espermatogoniais, seu cultivo *in vitro* na tentativa de amplificar o número destas células, diferenciação até espermatozoides e a criopreservação. Neste sentido, o estudo das células-tronco espermatogoniais com o objetivo de preservar a fertilidade deste grupo de pacientes é de fundamental relevância.

Nas últimas décadas pesquisadores têm trabalhado para desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* de SSCs (KANATSU-SHINOHARA *et al.*, 2005; NAGANO *et al.*, 1998; PERRARD *et al.*, 2016). Os principais desafios são manter as células-tronco espermatogoniais se autorrenovando sem entrarem em processo de diferenciação e também que esse cultivo possa ser realizado por longos períodos (meses) sem o risco de contaminações e alterações significativas na estrutura do DNA dessas células.

A criopreservação de células-tronco espermatogoniais surge como uma alternativa em relação ao cultivo *in vitro* por longos períodos. O tempo entre a coleta das SSCs, a cura do paciente e o momento ideal para o transplante pode levar meses, portanto, a criopreservação dessas células faz-se necessária. No entanto, muitos estudos ainda são necessários, principalmente relacionados à segurança das células transplantadas, antes dessa técnica ser empregada para o uso clínico.

Dada a importância que a preservação da fertilidade masculina representa e a escassa literatura que aborda a criopreservação de tecido testicular, o presente trabalho teve como objetivo comparar dois protocolos de vitrificação de tecido testicular em camundongos já descritos e comprovar se as SSCs isoladas desse tecido são capazes de formar colônias nos túbulos seminíferos de animais receptores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENTENDENDO O QUE É UMA SSC

Células-tronco espermatogonial (SSC, do inglês *spermatogonialstemcell*) ou espermatogônia é o termo utilizado para denominar células germinativas diploides relativamente não-especializadas presentes no epitélio seminífero após o começo da espermatogênese a qual é capaz de realizar divisões mitóticas originando ao final espermatócitos primários (DE ROOIJ; RUSSEL, 2000).

Quanto à origem das SSCs, em um estudo apresentado por Lawson e Pedersen (1992), os autores puderam comprovar que durante a gastrulação há uma linhagem de células derivadas do epiblasto denominadas de células germinativas primordiais (PGCs, do inglês *primordial germcells*), as quais migram para regiões posteriores do feto. Durante a migração pelas cristas genitais, as PGCs se proliferam e ao serem envolvidas por células de Sertoli e células peritubulares na crista gonadal passam a ser chamadas de gonócitos (CLERMONT, 1963). Segundo Bellvé e colaboradores (1977), em camundongos, os gonócitos que estão quiescentes começam a se diferenciar por volta do terceiro dia após o nascimento e ao sexto dia de vida tornam-se SSCs.

Durante a espermatogênese, uma única SSC, após várias divisões mitóticas e duas meióticas, pode dar origem a 2048 ou às vezes a até 4096 espermatozoides (RUSSEL *et al.*, 1990). No momento em que uma célula-tronco espermatogonial recebe estímulos para começar a se dividir, ela pode seguir por dois caminhos diferentes de divisão celular: inicia um processo de autorrenovação ou dará origem a células que formarão os espermatozoides.

Embora ainda não haja um consenso, atualmente são propostos dois modelos de como as SSCs se dividem que são o modelo de divisão simétrica ou o modelo de divisão assimétrica (DE ROOIJ; RUSSEL, 2000). No modelo de divisão simétrica duas células idênticas são originadas ou duas células ligadas por pontes intercelulares e comprometidas com a diferenciação são geradas. O modelo de divisão assimétrica considera que uma SSC pode dar origem a uma célula idêntica e a outra que, apesar de ser semelhante, está comprometida com a diferenciação (OATLEY; BRINSTER, 2008). Como este último modelo ainda não foi comprovado, a maioria dos estudiosos assume o modelo de divisão simétrica como sendo válido (figura 1).

Figura 1. Divisão simétrica *versus* divisão assimétrica de SSC.

FONTE: (Adaptado de DeRoos e Russel, 2000).

O modelo para classificação de células-tronco espermatogoniais proposto por Huckins em 1971, conhecido como modelo A_s , é o mais aceito. Nesse modelo, ele subdividiu espermatogônias tipo A em sete grupos: A_{simples} (A_s), A_{pareada} (A_{pr}), A_{alinhada} (A_{al}), A_1 , A_2 , A_3 e A_4 . As espermatogônias A_s servem de base para a contínua produção de gametas masculinos, pois são as que possuem potencial de autorrenovação e as A_{pr} são células-filhas das A_s que continuam conectadas por uma ponte citoplasmática intercelular e dão origem às demais células da linhagem germinativa (DE ROOIJ; GROOTEGOOD, 1998). Já as A_{al} se dividem formando cadeias de 4, 8 ou 16 células (A_{al-4} , A_{al-8} e A_{al-16} , respectivamente) que por sua vez se diferenciam em espermatogônias A_1 . Após seis divisões mitóticas surgem as células A_2 , A_3 , A_4 e, finalmente, espermatogônias do tipo B, que originarão espermatócitos no final da última divisão mitótica (IZADYAR *et al.*, 2002). Somente as células A_s são consideradas SSC em camundongos (DE ROOIJ, 1998; DETTIN *et al.*, 2003). Entretanto, Nakagawa e colaboradores (2010) propõem um novo comportamento para espermatogônias, sugerindo que espermatogônias A_{al-4} ainda possuem a capacidade de retornar ao estágio de espermatogônias A_s .

O esquema proposto por Huckins (1971) é aplicado para a maioria dos mamíferos, no entanto para primatas, incluindo o homem, Clermont (1963) observou algumas diferenças em espermatogônias de homens. Com base na afinidade de coloração do núcleo dessas células, observadas por meio de microscópio de luz, ele classificou em dois tipos principais: espermatogônias tipo A_{escuras} (do inglês, A_{dark}) e espermatogônias $A_{\text{pálidas}}$ (do inglês, A_{pale}).

Embora haja algumas diferenças quanto ao padrão de renovação e proliferação desses dois tipos de células, ainda assim o modelo de proliferação e classificação proposto por Huckins (1971), baseado no estudo de espermatogônias de ratos adultos, e é muito similar ao que ocorre em primatas e homens (DE ROOIJ; RUSSEL, 2000).

2.2 PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE NA ESPÉCIE HUMANA

A preservação da fertilidade em machos vem sendo abordada há décadas, desde os primeiros protocolos de congelamento de sêmen descritos por Polge e colaboradores (1949^{apud}SHEHATA; RI-CHENG CHIAN, 2010, p.41) utilizando pela primeira vez glicerol para proteção de espermatozoides a baixas temperaturas, até a criopreservação de tecido testicular com consequente espermatogênese *in vitro* (PERRARD *et al.*, 2016) descrita mais recentemente.

Na literatura científica estão muito bem descritos os efeitos deletérios da quimioterapia sobre as SSCs em pacientes com câncer (HOWELL; SHALET, 2001; LASS *et al.*, 2001). E os efeitos negativos da quimioterapia não são apenas fisiológicos. Por exemplo, Green *et al.* (2003) corroboraram com a importância da preservação da fertilidade em pacientes oncológicos visto que muitos demonstram o desejo de serem pais após o tratamento.

Holoch e Wald (2011) em breve revisão de literatura levantam as opções disponíveis atualmente para a preservação da fertilidade em homens. Nessa revisão, fica claro que para homens adultos a preservação da fertilidade pode ser feita com a criopreservação do sêmen, a qual já está bem estabelecida. Para pacientes com baixa concentração de espermatozoides pode-se utilizar a técnica de Injeção de Espermatozoides Intra-Citoplasmática (ICSI, do inglês *IntracytoplasmicSpermInjection*). Até mesmo em homens azoospermicos pode-se realizar microcirurgias para recuperação de espermatozoides do epidídimo e após empregar na ICSI. No entanto, em meninos pré-púberes a alternativa mais estudada é o isolamento de células-tronco espermatogoniais, seu cultivo *in vitro*, diferenciação até espermatozoides e a criopreservação. Neste sentido, o estudo das células-tronco espermatogoniais com o objetivo de preservar a fertilidade deste grupo de pacientes é de fundamental relevância.

2.3 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DE SSCs

No camundongo adulto, somente cerca de 0,03% das células germinativas são SSC, o que corresponde a aproximadamente 35000 células A_s (TEGELENBOSCH; DE ROOIJ, 1993). Em estudo realizado por Shinohara e colaboradores (2001) constatou-se que em camundongos adultos criptorquidas, usualmente utilizado como modelo para o estudo de SSCs, a população absoluta de células-tronco espermatogoniais isoladas foi 39 vezes maior em relação a neonatos e 6 vezes maior em relação a filhotes pré-púberes. No entanto, a quantidade de células isoladas por grama de testículo e o número de colônias formadas após transplante de SSCs é maior em neonatos. Sendo assim, o isolamento de células germinativas de animais mais jovens favorece a seleção de populações mais puras de SSCs nessa espécie, apesar do total obtido ser menor.

Para o isolamento das SSCs diversos protocolos já foram testados. As principais variáveis entre um protocolo e outro diz respeito ao tempo de incubação com enzimas, a diferença de temperatura durante a incubação, as diferentes concentrações das enzimas utilizadas e também se é realizada agitação ou não durante a incubação (BELLVÉ *et al.*, 1977; FUJIN SHEN *et al.*, 2010; OGAWA *et al.*, 1997; VAN PELT *et al.*, 1996).

Além do isolamento de quantidade suficiente de células com uma boa viabilidade, o sucesso do cultivo *in vitro* de SSCs depende posteriormente de seu enriquecimento ou seleção. A seleção das células murinas isoladas em um gradiente descontínuo de Percoll® foi descrita por Van Pelt e colaboradores (1996). O plaqueamento diferencial, proposto por Izadyar e colaboradores (2002) consiste em cultivar *in vitro* em placas de Petri todas as células isoladas após a digestão por um período de aproximadamente 16 horas. Após esse período, as células de Sertoli e mióidesperitubulares se aderem ao fundo da placa, enquanto as células da linhagem germinativa ficam em suspensão e são transferidas para outra placa de cultivo ou são destinadas à congelação. Outros métodos para seleção são o cultivo das células isoladas em placas de Petri em que a base do interior destas foi previamente coberto com uma camada de laminina (SHINOHARA *et al.*, 2000) ou com uma camada de gelatina (KAOMEI GUAN *et al.*, 2009). Nos últimos anos, com a descoberta de marcadores moleculares a técnica de separação celular ativada por fluorescência (FACS, do inglês *fluorescence-activated cell sorting*) tem permitido a purificação da população de células-tronco espermatogoniais com uso de anticorpos conjugados à fluoróforos (SHINOHARA *et al.*, 2000). Paralelamente, outra técnica tão eficiente quanto a FACS tem sido empregada: a

separação células ativada magneticamente (MACS, do inglês *magnetic-activated cell sorting*). A MACS apresenta como vantagem o fato das células não passarem por sistemas de colunas de fluxo contínuo, não comprometendo tanto a viabilidade celular. Nessa técnica são usados anticorpos para marcadores de superfície que, ao invés de serem conjugados à fluoróforos, são conjugados com “beads” magnéticas. A associação dessas duas técnicas tem sido estudada especialmente nos casos onde se deseja uma população de células-tronco espermatogoniais puríssima, como em suspensões de células testiculares de pacientes com câncer (GEENS *et al.*, 2007).

2.4 CULTIVO IN VITRO X CRIOPRESERVAÇÃO

Nas últimas décadas pesquisadores têm trabalhado para desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* de SSCs que suportem a autorrenovação e a expansão do número dessas células. Os principais desafios são manter as células-tronco espermatogoniais se autorrenovando sem entrarem em processo de diferenciação e também que esse cultivo possa ser realizado por longos períodos (meses) sem o risco de contaminações e alterações significativas na estrutura do DNA dessas células.

Em 2005, Kanatsu-Shinohara e colaboradores publicaram um estudo no qual conseguiram desenvolver uma condição para a cultura de células-tronco germinativas livre de soro, em que a proliferação de células de camundongos doadores foi suportada por mais de seis meses. Em um ambiente livre de soro, a maioria dos tipos celulares exige a adição de determinados fatores de crescimento e hormônios para promover sua proliferação e sobrevivência (KANATSU-SHINOHARA *et al.*, 2005). O fator de crescimento GDNF produzido pelas células de Sertoli tem sido considerado uma importante molécula reguladora da proliferação de SSCs *in vitro* de camundongos (KANATSU-SHINOHARA *et al.*, 2003; NAGANO *et al.*, 2003). Além do GDNF, outros fatores de crescimento e de transcrição têm sido relacionados à manutenção e proliferação de SSCs *in vitro*. Entre os principais estão o fator de célula-tronco (SCF, do inglês *stem cell factor*) (KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2004a), o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*) (KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2004b). O cultivo *in vitro* de células espermatogoniais por longos períodos deve ser suportado também pela associação com outros tipos celulares como fibroblastos fetais murinos mitoticamente

inativados (MEF, do inglês *mouse embryonic fibroblasts*) ou com linhagem imortal de fibroblastos fetais murinos STO mitoticamente inativados (NAGANO *et al.*, 1998).

Mais recentemente, Perrard e colaboradores (2016) publicaram um trabalho no qual demonstraram que foi possível obter espermatozoides morfologicamente maduros de ratos e humanos por meio de espermatogênese realizada em cultivo *in vitro*. Os túbulos seminíferos isolados foram submetidos a congelação lenta e após descongelados, cultivados em um substrato biorreator tridimensional.

A criopreservação de células-tronco espermatogoniais surge como uma alternativa em relação ao cultivo *in vitro* por longos períodos, pois como o intuito é transplantar essas células novamente para o testículo de seu doador, na maioria dos casos é necessário aguardar por longos períodos, tornando assim o cultivo *in vitro* mais dispendioso.

Desde o momento em que se provou que o transplante de células-tronco espermatogoniais de um doador era capaz de restaurar a fertilidade em um receptor (BRINSTER; AVARBOCK, 1994), a criopreservação destas células tem sido objeto de estudo para preservação da fertilidade (SOK SIAM GOUK *et al.*, 2011). Em meninos jovens submetidos à quimioterapia o transplante de células-tronco espermatogoniais após a cura pode ser uma alternativa para a recuperação da fertilidade (HOLOCH; WALD, 2011). O tempo entre a coleta das SSCs, a cura do paciente e o momento ideal para o transplante pode levar meses, portanto, a criopreservação dessas células faz-se necessária. No entanto, muitos estudos ainda são necessários, principalmente relacionados à segurança das células transplantadas, antes dessa técnica ser empregada para uso clínico.

O primeiro relato de sucesso na recuperação da fertilidade após criopreservação e transplante de células-tronco espermatogoniais foi descrito em camundongos por Avarbock, Brinster e Brinster (1996). Nesse estudo foram utilizadas técnicas padrões de congelação de células somáticas. Hoje já existem várias metodologias para a criopreservação de SSCs, tanto para as células isoladas quanto para fragmentos de testículo. Os protocolos de congelação lenta utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como crioprotetor são utilizados principalmente na criopreservação de SSCs isoladas (ALIPOOR *et al.*, 2009; ZHE YUAN; RUOYU HOU; JI WU, 2009). Frederickx e colaboradores (2004) compararam protocolos de congelação lenta controlada e não-controlada, utilizando como crioprotetores tanto DMSO quanto EG (etilenoglicol). Outra metodologia que tem sido estudada é a vitrificação, esta sendo mais utilizada na criopreservação de fragmentos/biópsias de testículos e tem apresentado ótimos resultados (SOK SIAM GOUK *et al.*, 2011; CURABA *et al.*, 2011). No entanto, muitos desses estudos que avaliaram diferentes protocolos de vitrificação não concluíram uma etapa

muito importante: a verificação de formação de colônias de SSCs nos túbulos seminíferos em testículos de animais receptores após o transplante.

2.5 TRANSPLANTE DE SSCs

Um dos caminhos para se verificar a preservação da capacidade das SSCs em restabelecer a espermatogênese *in vivo* é por meio do transplante destas células para animais receptores. A produção de espermatozoides maduros de um doador pelo testículo de um receptor após transplante de espermatogônias já foi reportada em camundongos (BRINSTER; AVARBOCK, 1994), suínos (MIKKOLA *et al.*, 2006), caprinos (HONARAMOOZ *et al.*, 2003), bovinos (IZADYAR *et al.*, 2003), macacos (SCHLATT *et al.*, 2002) e também entre humanos (RADFORD, 2003), embora os resultados finais ainda não estejam publicados.

Para o transplante é necessário que o receptor tenha sua população de células germinativas depletada. Para isso, a metodologia mais empregada é com o uso de quimioterápicos, como o busulfan (BUCCI; MEISTRICH, 1987), pois é de fácil administração e o resultado do efeito na espermatogênese pode ser controlado pela dose (OGAWA *et al.*, 1997). Também podem ser usados a irradiação (WITHERS *et al.*, 1974), animais criptorquidas (MENDIS-HANDAGAMA; KERR; KRETSER, 1990), camundongos homozigotos W/W, locus gênico *whitespotting*, os quais não apresentam espermatogênese (MINTZ; RUSSELS, 1957) e também por estresse térmico (WHENZI MA *et al.*, 2011). Ogawa e colaboradores (1997) descrevem perfeitamente as principais metodologias para o transplante de células-tronco espermatogoniais para testículos de camundongos, que são através dos ductos eferentes, pela *retetestis* ou diretamente nos túbulos seminíferos.

Sem dúvida o preparo do receptor e a técnica de eleição de transplante têm influência na taxa de colonização pelas SSCs (OGAWA *et al.*, 1997). No entanto, o sucesso da colonização depende muito do enriquecimento da solução injetada, ou seja, do número de células-tronco espermatogoniais injetadas. As técnicas de FACS e MACS têm contribuído muito para a separação por meio de marcadores moleculares proporcionando altas taxas de colonização (SHINOHARA *et al.*, 2000). O transplante e a purificação de SSCs mostram-se etapas muito importantes no restabelecimento da fertilidade em meninos submetidos a tratamentos contra o câncer, pois após a cura o transplante de células espermatogoniais

contaminadas com células cancerosas pode levar ao desenvolvimento de um novo câncer, como já foi demonstrado em ratos por Jahnukainen e colaboradores (2001). Para isso, estudos têm sido realizados apresentando resultados promissores (FUJITA *et al.*, 2005; HERMANN *et al.*, 2011).

3 HIPÓTESE

A vitrificação de tecido testicular é uma metodologia de criopreservação de células-tronco espermatogoniais (SSCs) que pode garantir a formação de colônias após serem transplantadas para os túbulos seminíferos de animais receptores.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de células oriundas de tecido testicular de camundongos submetidos a dois protocolos distintos de vitrificação e, posteriormente, descrever o potencial de formação de colônias de SSCs (células-tronco espermatogoniais) em testículos receptores.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingirmos o objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Vitrificar testículos de camundongos C57BL6 GFP+ com 8 a 10 dias utilizando duas metodologias;
- Avaliar a viabilidade e concentração celular após descongelação e digestão dos testículos;
- Selecionar células que são SSCs;
- Transplantar as SSCs selecionadas para testículos de camundongos C57Bl6 selvagens;
- Verificar a integração e formação de colônias pelas células-tronco espermatogoniais nos testículos receptores.

5 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi executado no Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, localizado no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos que envolveram o uso de animais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade e está protocolado sob o número 1943300614.

5.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 64 camundongos da linhagem C57BL6/GFP+ (Proteína verde fluorescente, do inglês *Green fluorescent protein*) com idade entre 8 a 10 dias para a criopreservação dos testículos e 12 camundongos das linhagens C57BL6 com 8 a 10 semanas, os quais serviram como receptores. Todos os animais foram provenientes do biotério do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.2 COLETA E PREPARO DOS TESTÍCULOS

Para a coleta dos testículos, camundongos com 8 a 10 dias de idade foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical com auxílio de uma pinça de ponta fina. Foram coletados oito testículos por manipulação, correspondendo a quatro animais, 4 testículos foram utilizados para o Protocolo EG+Sacarose e 4 testículos para o Protocolo EG+DMSO+BSA. Foram realizadas um total de 16 manipulações para obtenção de um total de 32 palhetas vitrificadas com o Protocolo EG+Sac e 32 palhetas vitrificadas com o Protocolo EG+DMSO+BSA. Esse delineamento está exemplificado na figura 2.

Após desinfecção da região ventro-abdominal, incisão da pele e parede abdominal, os testículos foram expostos e separados de ligamentos, tecido adiposo e epidídimo (APÊNDICE O). Depois de coletar os testículos, grupos de 2 testículos foram transferidos para microtubos

contendo PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} e mantidos em gelo picado, 4°C. Previamente ao processo de criopreservação, os testículos foram transferidos para uma placa de Petri de vidro para a perfuração da túnica albugínea ou secção do testículo ao meio, conforme o protocolo de criopreservação a ser utilizado.

Figura 2 - Esquema do delineamento da etapa de coleta e vitrificação dos testículos ou fragmentos.

Fonte: (WORST, R.A., 2016).

5.3 VITRIFICAÇÃO DE TESTÍCULOS COM PERFURAÇÃO DA TÚNICA ALBUGÍNEA

No Protocolo EG+Sac, os testículos foram vitrificados utilizando o método descrito por Sok Siam Gouk e colaboradores (2011), com algumas modificações. A túnica albugínea dos testículos foi perfurada com auxílio de uma lâmina de bisturi nº11. Na desidratação, grupos de dois testículos foram transferidos para microtubos no qual permaneciam nos Meios de Vitrificação-EG+Sac com as concentrações de 10%, 17,5%, 25%, 32,5% e 40% de crioprotetor (APÊNDICES A – E) durante os tempos de 4 min., 1,5 min., 2 min., 1 min., e 1,5 min., respectivamente. Essas etapas foram realizadas à temperatura ambiente. O volume de Meio de Vitrificação utilizado em cada etapa foi de 0,5 ml. Durante a última etapa de desidratação, os testículos foram envasados por capilaridade em palhetas de sêmen de 0,5 ml, as quais foram previamente seccionadas pela metade. O volume de meio de vitrificação no qual os testículos permaneceram foi de aproximadamente 50 microlitros (APÊNDICE O). As

palhetas foram então lacradase, ao término do tempo, introduzidas rapidamente no nitrogênio líquido. Ao final, o aspecto do meio de vitrificação com os testículos era vítreo.

5.4 VITRIFICAÇÃO DE TESTÍCULOS COM SECÇÃO AO MEIO

O Protocolo EG+DMSO+BSA foi baseado em estudo de Curaba e colaboradores (2011), com algumas modificações. Resumidamente, os testículos foram seccionados ao meio contendo-os com uma pinça de ponta fina e cortando-os com uma lâmina de bisturi nº11, dando origem, portanto, a dois fragmentos de cada testículo. Na desidratação, grupos de quatro fragmentos foram transferidos para microtubos no qual permaneciam nos Meios de Vitrificação-EG+DMSO+BSA com as concentrações de 25%, 50% e 100% do crioprotetor (APÊNDICES F– H) durante os tempos de 5 min., 10 min. e 10 min., respectivamente. Durante essas etapas, os microtubos com os fragmentos permaneceram em gelo picado, 4°C. O envase dos fragmentos nas palhetas, volume de meio de vitrificação em que os fragmentos permaneceram e introdução das palhetas no nitrogênio líquido foram idênticas ao Protocolo EG+Sac (APÊNDICE O).

5.5 DELINEAMENTO NAS ETAPAS SEGUINTE

As etapas da descongelação, digestão dos testículos/fragmentos, seleção das SSCs e transplante foram realizadas em quatro dias consecutivos (replicatas), sendo que para cada dia foram descongeladas oito palhetas de cada protocolo de vitrificação. As palhetas com testículos/fragmentos vitrificados da 1ª à 8ª manipulação foram utilizadas na 1ª e 3ª replicatas e as palhetas com testículos/fragmentos vitrificados da 9ª à 16ª manipulação foram utilizadas na 2ª e 4ª replicatas. Cada palheta possuía dois testículos (Protocolo EG+Sac) ou quatro fragmentos/testículos seccionados ao meio (Protocolo EG+DMSO+BSA). Após a digestão e determinação da concentração e viabilidade de cada palheta, todas as células testiculares provenientes dos testículos vitrificados com o Protocolo EG+Sac foram misturadas formando um “pool” e submetidas à MACS. O mesmo ocorreu para as células obtidas dos fragmentos vitrificados com o Protocolo EG+DMSO+BSA. Esta etapa está demonstrada na figura 3.

Figura 3 - Esquema do delineamento da etapa de descongelação, digestão dos testículos/fragmentos, seleção e transplantadas SSCs.

Fonte: (WORST, R.A., 2016).

5.6DESCONGELAÇÃO DOS TESTÍCULOS

As palhetas com os testículos foram retiradas do nitrogênio líquido, aguardou-se durante 5 segundos à temperatura ambiente para serem introduzidas em banho-maria a 37°C durante 15 segundos.

A descongelação dos testículos vitrificados com o Protocolo EG+Sacfoi realizada expondo progressivamente os testículos a soluções de concentrações decrescentes de sacarose, também como descrito porSok Siam Gouk e colaboradores (2011). As palhetas foram desinfetadas com álcool 70% e os testículos transferidos para um microtubo contendo 0,5 ml de uma solução de PBS + 0,6 mol/l de sacarose, permanecendo nesta solução durante5 minutos,à temperatura ambiente. Após esse tempo, a solução com os testículos foi removida para a introdução de outra de PBS + 0,3 mol/l de sacarose, permanecendo durante 4 minutos. Ao término da segunda incubação, a solução de PBScom sacarose foi removida para a adição somente de PBS. Nessa solução, os testículos permaneceram durante 3 minutos. Essa etapa foi repetida mais uma vez.

No Protocolo EG+DMSO+BSA foi utilizado a exposição progressiva dos testículos às soluções de concentrações decrescentes de sacarose, também como descrito por Curaba e colaboradores (2011). As palhetas foram desinfetadas com álcool 70% e os testículos transferidos para um microtubo, no qual permaneceram nas soluções de DMEM (GIBCO; cat: 11965-092) com concentrações de 1 mol/l, 0,5 mol/l e 0,25 mol/l de sacarose, durante 5 minutos em cada solução, à temperatura ambiente.

5.7 DIGESTÃO DOS FRAGMENTOS DE TESTÍCULOS

Após o processo de descongelação dos testículos, a solução de descongelação foi removida e os testículos foram macerados com auxílio de uma tesoura de ponta fina e então incubados em banho-maria a 37°C durante 15 minutos em 10 partes de Meio de Digestão 1, a base de collagenase e DNase (APÊNDICE I), para 1 parte de tecido testicular macerado. A cada 5 minutos esse tecido era ressuspensão por meio de agitação do tubo. Transcorrido esse tempo, o tecido testicular foi centrifugado durante 5 minutos a 300 x g. Após, o sobrenadante foi removido e adicionou-se Meio de Digestão 2, a base de tripsina, EDTA e DNase (APÊNDICES J – L), incubando durante 5 minutos nas mesmas condições anteriores. Ao término desse tempo, foram adicionados 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO; cat: 12657-029) para inativar as enzimas. As células em suspensão foram centrifugadas novamente a 300 x g por 5 minutos. O sedimento resultante foi ressuspensão em DMEM acrescido de 30 mg/ml de BSA (Sigma A9647). Uma alíquota foi retirada para verificação da viabilidade e determinação da concentração total de células em Câmara de Neubauer pela coloração com Azul Tripán 0,4%, na diluição de 1:2.

5.8 SELEÇÃO DE SSCs POR MEIO DE MACS

A seleção das células-tronco espermatogoniais foi realizada por meio da marcação de anticorpos primário anti-Thy1.2 (ab110835, Abcam) e a separação celular por “beads” magnéticas foi realizada usando OctoMACSTMseparator e colunas MS (MiltenyiBiotec, Gladbach, Alemanha) e o procedimento foi de acordo com as instruções do fabricante.

Após a determinação da concentração e da viabilidade celular de cada manipulação, formou-se o “pool” das manipulações e as células foram centrifugadas (300 x g por 5 minutos) e então ressuspensas em 200 µl de PBS com FCS (Soro fetal bovino, do inglês *Fetal calf serum*) a 10%. O anticorpo primário anti-Thy1.2 foi adicionado na concentração de 1:250. As células foram incubadas com o anticorpo primário durante 30 minutos sob agitação à temperatura de 8°C. Terminada a incubação foi adicionado 1 ml de MACS Buffer (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA - Sigma E5134) e centrifugou-se a 300 x g durante 10 minutos. O sedimento formado foi ressuspense em 80 µl de MACS Buffer para então ser adicionado 20 µl de MACS MicroBeads anti-IgG de camundongo (MiltenyiBiotec, Gladbach, Alemanha) como anticorpo secundário. As células foram incubadas com o anticorpo secundário nas mesmas condições anteriores durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 ml de MACS Buffer e centrifugou-se novamente a 300 x g durante 10 minutos. O sedimento formado foi ressuspense em 0,5 ml de MACS Buffer para proceder a MACS conforme instruções do fabricante. Resumidamente, sob atuação de um campo magnético, a suspensão de células foi adicionada à coluna MS, aguardou-se o término do gotejamento em um tubo de descarte e procedeu-se três lavagens sequenciais com 0,5 ml de MACS Buffer. A coluna foi retirada do campo magnético e então adicionou-se 1 ml de MACS Buffer para introdução do êmbolo na coluna com consequente depósito da suspensão em um microtubo. As células recolhidas após a primeira lavagem são consideradas negativas para o Thy1.2 e as células obtidas após a segunda lavagem, já sem o campo magnético atuando, são consideradas positivas para o Thy1.2. Somente a população positiva para Thy1.2 foi utilizada para o transplante. Uma alíquota desta suspensão foi retirada para determinação da concentração e viabilidade celular e a suspensão de células foi centrifugada a 300 x g durante 10 minutos. O sedimento resultante foi ressuspense em 8 µl de MACS Buffer e adicionado 2 µl de Azul Tripan 0,4%.

5.9 TRANSPLANTE DE SSCs PARA CAMUNDONGOS RECEPTORES

A metodologia utilizada para o transplante foi semelhante à descrita previamente por Ogawa e colaboradores (1997) e Lin Tang, Rodriguez-Sosa e Dobrinski (2012). Resumidamente, camundongos C57BL6 com 8 a 10 semanas foram tratados com 50mg/kg de busulfan (APÊNDICE M e APÊNDICE O), por via intraperitoneal, 4 a 6 semanas previamente ao transplante.

Para anestesia, os animais foram tratados com associação de 2 mg/kg de acepromazina (Acepran 0,2%®, Vetnil, Louveira, SP, Brasil) + 70 mg/kg de cloridrato de ketamina (Dopelen, Ceva, Paulínea, SP, Brasil) + 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Equisedan, J.A. Saúde Animal, Patrocínio Paulista, SP, Brasil) por via intraperitoneal.

Estando o animal em plano anestésico e com a região abdominal e inguinal tricotomizada no dia anterior, fez-se uma desinfecção com álcool 70% e após incisão de aproximadamente 1 cm na pele e musculatura abdominal, seguido da exposição do testículo e epidídimo do lado direito do animal (APÊNDICE O). O testículo esquerdo não foi manipulado e serviu como controle da técnica. A solução com as células foi aspirada por um capilar de vidro estirado e introduzida nos túbulos seminíferos através de um dos ductos eferentes. A concentração de células injetadas variou de 5×10^3 a 10×10^3 células viáveis. A taxa de preenchimento dos túbulos variou de 70 % a 95%, avaliado por visualização de todo o testículo (APÊNDICE O). O testículo direito foi introduzido de volta à cavidade abdominal e realizada a síntese da musculatura e pele. Em seguida, foi administrado para controle da dor e inflamação 2,5 mg/kg de flunixin meglumine (Desflan®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil) e após a cada 12 horas durante 3 dias consecutivos. Os animais ficaram sob avaliação até o momento do retorno da anestesia, em caixas isoladas com suprimento de calor fornecido por lâmpadas infravermelhas.

5.10 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE SSCs

Seis semanas após o transplante das SSCs os camundongos foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical e a colonização celular foi avaliada. Os testículos que receberam as células e o controle foram dissecados, a túnica albugínea foi removida e os

túbulos seminíferos foram incubados em solução de PBS + 1 mg/ml de collagenase tipo IV (Sigma C5138), durante 15 minutos em banho-maria a 37°C, numa proporção de 1 parte de tecido para 10 de solução. A cada 5 minutos a solução foi homogeneizada delicadamente para melhorar a ação da collagenase sobre os túbulos seminíferos. Ao final da incubação, foi removida uma parte do sobrenadante da solução e o restante contendo os túbulos dissociados foi transferido para uma placa de Petri de 40 mm com fundo de vidro (WillCo-Dish®, Amsterdam, Holanda). Os túbulos que não estavam bem dissociados foram separados com auxílio de duas agulhas hipodérmicas. O restante da solução foi removida e os túbulos lavados por duas vezes com PBS. A visualização e contagem das colônias foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus IX-81 (Tóquio, Japão) com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 600 nm. As regiões no interior dos túbulos seminíferos contendo aglomerados de células verde-fluorescentes, conectadas entre si foram consideradas como colônia de SSCs provenientes dos animais doadores (C57BL6 GFP+). Os túbulos seminíferos provenientes do testículo controle foram avaliados para determinar a autofluorescência das células testiculares.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando o software SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, EUA) e testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Quando as premissas da análise estatística não foram obedecidas, os dados sofreram transformação. Foi utilizado o procedimento MIXED do programa considerando-se o efeito das formas de vitrificação dos testículos, Protocolo EG+Sac e Protocolo EG+DMSO+BSA, e os dias de descongelação seguida pela digestão dos testículos vitrificados nos dois protocolos. Para análise de variância utilizou-se o procedimento MIXED. O nível de significância utilizado foi de 5% para rejeitar a hipótese de nulidade.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PROTOCOLOS PARA VITRIFICAÇÃO DE TESTÍCULO

Para este estudo foram selecionados dois protocolos já descritos na literatura internacional que obtiveram bons resultados na vitrificação de fragmentos de testículo.

O denominado Protocolo EG+Sac foi descrito no trabalho publicado por Sok Siam Gouk e colaboradores (2011). Nesse estudo foram comparados protocolos de vitrificação, congelação ultrarrápida e congelação lenta. Também foi comparado o efeito da manipulação da túnica albugínea, a qual foi perfurada com uma agulha, totalmente removida ou quando o testículo era seccionado ao meio. Para avaliação da eficiência dos métodos testados, após a descongelação foram avaliadas a viabilidade das células, produção hormonal pelos fragmentos e seleção das SSC por “beads” magnéticas. Ao final, eles concluíram que o protocolo de vitrificação apresentou as maiores taxas de viabilidade e que a melhor maneira de realizar essa vitrificação é com a túnica albugínea perfurada por uma agulha. Desta forma, para o presente trabalho, optou-se por utilizar a metodologia que apresentou maior viabilidade celular e facilidade de execução.

Em relação ao método descrito por Sok Siam Gouk *et al.* (2011) houve poucas modificações. A principal foi em relação ao modo de envase. Naquele foi utilizado o método “palheta dentro de palheta”, onde os testículos são envasados em uma palheta de 0,25 ml e então esta é colocada no interior de outra de 0,5 ml, e no presente estudo optou-se por envasar os testículos diretamente na palheta de 0,5 ml e utilizou-se um lacrador para impedir o contato direto do nitrogênio líquido com os testículos. Isto não prejudicou o processo de vitrificação, pelo contrário, além de proteger de contaminações decorrentes do armazenamento, possibilitou introduzir na palheta testículos um pouco maiores, de animais com oito a dez dias idade, e garantindo também que o aspecto do meio após a vitrificação fosse o esperado, vítreo.

O segundo protocolo de vitrificação escolhido, Protocolo EG+DMSO+BSA, foi descrito por Curaba e colaboradores (2011). Eles compararam protocolos de congelação lenta e vitrificação. Para ambos os protocolos os testículos foram seccionados ao meio. A avaliação da eficiência dos protocolos de criopreservação foi verificada por meio de testes de viabilidade e de medições de lactato desidrogenase (LDH), apoptose e avaliação histológica dos túbulos seminíferos após período de cultivo *in vitro* dos fragmentos. Como conclusão,

eles afirmaram que o protocolo de vitrificação é uma abordagem promissora tão eficiente quanto os protocolos de congelação lenta por meio de um processo mais rápido e conveniente.

Em relação ao procedimento de vitrificação adotado por Curabaet *al.* (2011) uma das alterações foi no que diz respeito ao meio base utilizado, o qual foi o MEM/Glutamax I suplementado com albumina sérica humana (HSA, *HumanSerumAlbumin*). Neste estudo optou-se por utilizar o DMEM, por ser o mesmo utilizado para o Protocolo EG+Sac, e se substituiu a HSA pelo BSA, pois são fontes proteicas similares. A metodologia para envase e criopreservação também foi modificada, visto que naquele trabalho os fragmentos eram envasados sem estarem envoltos por meio de vitrificação e em palhetas abertas, as quais eram imersas no nitrogênio para depois serem colocadas em um criotubo e vedadas. Aqui foi mantido a mesma metodologia utilizada para o Protocolo EG+Sac devido as vantagens citadas anteriormente.

6.2 DESCONGELAÇÃO E OBTENÇÃO DE CÉLULAS TESTICULARES DOS TESTÍCULOS/FRAGMENTOS VITRIFICADOS

Logo após o processo de descongelação e digestão do tecido testicular foram verificados o porcentual e a concentração total de células viáveis por meio da coloração com Azul Tripán.

A viabilidade celular do Protocolo EG+DMSO+BSA foi maior comparada ao Protocolo EG+Sac ($p < 0,0001$), $82,9\% \pm 1,64$ e $74,4\% \pm 1,88$, respectivamente (figura 4).

Figura 4- Viabilidade de células testiculares provenientes de testículos/fragmentos vitrificados com o Protocolo EG+Sac e Protocolo EG+DMSO+BSA. Cada valor corresponde a porcentagem média $\pm$ EP (Erro Padrão) das células viáveis obtidas de quatro replicatas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,0001$).

Fonte: (WORST, R.A., 2016).

O estudo publicado por SokSianGouket *al.* (2011) apresentou dados de viabilidade celular após a descongelação de 95%. No caso do trabalho de Curabaet *al.* (2011), embora a metodologia utilizada para avaliar a viabilidade ter sido diferente da utilizada no presente estudo, a viabilidade celular foi semelhante a de células obtidas de testículos frescos.

Mesmo obtidos valores inferiores aos descritos por SokSianGouket *al.* (2011) e Curabaet *al.* (2011), para protocolos de vitrificação de tecidos consideramos, neste estudo a viabilidade obtida foi satisfatória.

Quando comparadas a viabilidade celular entre os Protocolos EG+Sac e EG+DMSO+BSA ao longo das quatro replicatas, observamos diferenças, ($p < 0,05$), na 1ª e 4ª replicata (figura 5).

Figura 5 - Viabilidade de células testiculares provenientes de testículos/fragmentos vitrificados com o Protocolo EG+Sac e Protocolo EG+DMSO+BSA, comparando as quatro replicatas de descongelamento. Cada valor corresponde a porcentagem média $\pm$ EP (Erro Padrão) das células viáveis obtidas de quatro replicatas. * indicam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro da mesma replicata.

Fonte: (WORST, R.A., 2016).

Está claro que o Protocolo EG+DMSO+BSA apresentou uma melhor taxa de viabilidade celular em relação ao Protocolo EG+Sac, no entanto, como podemos observar na figura 3, a viabilidade das células do Protocolo EG+Sac na primeira replicata foi mais baixa ($60,6\% \pm 3,46$). Nas demais replicatas a viabilidade ficou entre $77,3\% \pm 2,15$ e $80,8\% \pm 3,07$. É possível que essa viabilidade obtida na primeira replicata pudesse ter sido maior, pois as alíquotas com as células diluídas em Azul Tripan tiveram que aguardar por um tempo maior para começarem a ser avaliadas e isto pode ter comprometido a avaliação e sua viabilidade. Essa deficiência foi corrigida nas demais replicatas.

Em relação ao total de células viáveis recuperadas após a digestão dos testículos/fragmentos, o Protocolo EG+DMSO+BSA apresentou maior quantidade de células recuperadas comparado ao Protocolo EG+Sac ($p < 0,0001$), $1,35 \times 10^6 \pm 0,1$ e $0,43 \times 10^6 \pm 0,04$ células viáveis, respectivamente (figura 6).

Figura 6- Total de células testiculares viáveis provenientes de testículos/fragmentos vitrificados com o Protocolo EG+Sac e Protocolo EG+DMSO+BSA. Cada valor corresponde à concentração média $\pm$ EP (Erro Padrão) de células viáveis obtidas de quatro replicatas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,0001$).

Fonte: (WORST, R.A., 2016).

Quando comparado o total de células viáveis entre os Protocolos EG+Sac e EG+DMSO+BSA ao longo das quatro replicatas, observamos diferença, ($p<0,05$), em todas as replicatas (figura 7).

Figura 7 - Total de células testiculares viáveis provenientes de testículos/fragmentos vitrificados com o Protocolo EG+Sac e Protocolo EG+DMSO+BSA, comparando as quatro replicatas de descongelamento. Cada valor corresponde a concentração média $\pm$ EP (Erro Padrão) de células viáveis obtidas de quatro replicatas. * indicam diferença estatística ($p<0,05$) dentro de uma mesma replicata.

Fonte: (WORST, R.A., 2016).

Não só a viabilidade das células após a digestão do tecido celular é um fator importante, mas também a quantidade total de células viáveis que são recuperadas desse tecido.

A digestão do tecido testicular vitrificado é um procedimento que pode comprometer essa taxa de viabilidade e número de células recuperadas. A metodologia que tem sido mais empregada foi a descrita por Bellvé *et al.* (1977) que consiste na incubação do tecido em solução contendo enzimas como hialuronidase, colagenase e tripsina. Esse método foi adaptado com algumas modificações para testículos de camundongos (VAN PELT *et al.*, 1996; KANATSU-SHINOHARA *et al.*, 2003). Em 2010, FujinShen *et al.* propuseram um protocolo de digestão realizado em menos tempo comparado ao protocolo proposto por Kanatsu-Shinohara *et al.* (2003) e obtiveram um maior número de células recuperadas. Esse estudo foi realizado com testículos frescos, portanto para testículos que sofreram processo de criopreservação ainda não existem trabalhos que demonstre qual é a metodologia mais adequada para digestão de tecido testicular. A metodologia para a digestão do tecido testicular descrita nesse estudo é semelhante à utilizada por Kanatsu-Shinohara *et al.* (2003), com exceção do tempo para incubação com tripsina que foi reduzido de 10 minutos para 5 minutos.

Dados de concentração total de células obtidas após a digestão do tecido testicular normalmente não são apresentados, como verificado no estudo de SokSianGouket *et al.* (2011).

6.3 SELEÇÃO DE SSCs POR MACS

Neste estudo realizou-se a seleção das células-tronco espermatogoniais por meio de “beads” magnéticas. Essas “beads” magnéticas conjugadas a uma IgG anti-camundongo se ligavam ao anticorpo primário Thy1.2 ou CD90 1.2. Esse marcador já está bem descrito e é muito utilizado para seleção de SSCs, especialmente de camundongos (KUBOTA *et al.*, 2004b; YINSHAN BAI *et al.*, 2016).

Para a MACS, como mencionado no item 5.8, realizou-se um “pool” das células testiculares provenientes das oito palhetas de cada protocolo. Como demonstrado na figura 4, houve variação no número total de células obtidas entre os dois protocolos e também entre as replicatas. Isto teve como consequência uma diferença na quantidade total de células submetidas à MACS entre o Protocolo EG+Sac e o Protocolo EG+DMSO+BSA, sendo maior

neste último. Portanto, era de se esperar que a quantidade de células obtidas após a MACS também sofresse essa variação.

Podemos descrever que o número total de células, nas quatro replicatas, para o Protocolo EG+Sac submetidas à MACS variou de $2,7 \times 10^6$ a $7,5 \times 10^6$ células viáveis e para o Protocolo EG+DMSO+BSA essa variação foi de $7,2 \times 10^6$ a $14,1 \times 10^6$ células viáveis. Essa diferença se confirmou no número de células obtidas após a seleção por “beads” magnéticas. O total de células recuperadas após a MACS das células vitrificadas com o Protocolo EG+Sac variou de 5×10^3 a 11×10^3 e com o Protocolo EG+DMSO+BSA variou de 6×10^3 a 25×10^3 , comparando as quatro replicatas.

6.4 TRANSPLANTEDAS SSCS E AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Para efeito de comparação entre os dois protocolos e assim determinar qual deles manteria a capacidade de colonização das células nos túbulos seminíferos de um animal receptor, como mencionado no item 5.9, foi determinado que cada testículo recebesse entre 5×10^3 a 10×10^3 células. Devido a quantidade de células isoladas após a MACS ter sido maior em alguns casos, principalmente nas células provenientes do Protocolo EG+DMSO+BSA, essas células foram divididas e transplantadas em mais de um animal.

As células foram transplantadas para o testículo de onze animais. No dia da terceira replicata um animal foi eutanasiado, pois as células extravasaram para fora do ducto eferente impossibilitando assim qualquer avaliação futura. No total foram transplantados quatro animais com células do Protocolo EG+Sac e sete animais com células do Protocolo EG+DMSO+BSA, justamente pelo número de células pós MACS recuperadas ter sido maior nesse último.

O protocolo anestésico adotado possibilitou que os animais entrassem em plano anestésico dentro de aproximadamente sete minutos após a aplicação e perdurou durante todo o período do transplante e síntese da musculatura abdominal e pele, a qual durou aproximadamente 30 minutos. O retorno dos animais aconteceu por volta de 4 a 5 horas após o início do protocolo anestésico.

A técnica de transplante de SSCs foi bem detalhada no trabalho publicado por Ogawa e colaboradores (1997). Neste artigo foram descritas três formas de transplante: injeção através dos ductos eferentes, introdução diretamente na *retetestis* e por último através de uma

ruptura de parte da túnica albugínea e introdução diretamente no interior dos túbulos seminíferos. Pode ser considerada uma técnica complexa, a qual exige pessoas treinadas, seja para localização e dissecação do testículo e tecidos adjacentes, mas também para introdução da agulha ou capilar no local desejado, a qual pode ser realizada com auxílio de micromanipulador ou, como no caso do presente estudo, manualmente.

De uma maneira geral, este estudo teve êxito no que diz respeito ao transplante de células-tronco espermatogoniais para testículos de camundongos receptores.

Os animais submetidos ao transplante foram eutanasiados após seis semanas. No momento da coleta foi avaliado o aspecto do testículo e áreas adjacentes, verificando se a vascularização do testículo foi comprometida e se havia formações de aderências, o que poderia ser atribuído a um processo inflamatório. O testículo esquerdo, escolhido para ser o controle foi utilizado como referência para auxiliar na obtenção dessas informações. Em nenhum animal foram observadas alterações que poderiam ter comprometido o sucesso da técnica de transplante.

Para a dissociação dos túbulos seminíferos foi utilizado o mesmo protocolo descrito em estudo desenvolvido em 2014 neste laboratório por Goissis e colaboradores (resultados não publicados). Diferentemente do que ocorreu nesse estudo, no presente trabalho essa dissociação não foi completa. Ao final do processo restavam túbulos que na visualização microscópica ficavam sobre outros túbulos. Esse fato não foi comprometedor para a avaliação e busca por possíveis colônias formadas pelas células transplantadas, visto que a expressão por elas da proteína verde fluorescente (GFP) é bem característica (APÊNDICE N). Dentre os animais transplantados com células do Protocolo EG+Sac (quatro testículos) somente foram encontradas colônias em dois testículos, sendo duas colônias em um e em outro três colônias. Para os testículos avaliados com as células do Protocolo EG+DMSO+BSA transplantadas (sete testículos) foram encontradas colônias em três deles, correspondendo a 24 colônias em um testículo, 2 colônias no segundo e 34 colônias no último. Embora com o número de animais transplantados não seja possível realizar uma comparação estatística entre os dois protocolos de vitrificação, ficou evidente que as células transplantadas provenientes do Protocolo EG+DMSO+BSA tiveram potencial de sobreviver ao processo de vitrificação e formar mais colônias comparadas ao Protocolo EG+Sac. Este foi o primeiro estudo a descrever a formação de colônias de células-tronco espermatogoniais provenientes de tecido testicular vitrificado nos túbulos seminíferos de testículos de animais receptores.

Os estudos publicados por Sok Siam Gouket *al.* (2011) e Curabaet *al.* (2011) demonstraram que muitas células de tecidos testiculares que passam pelo processo de

vitricificação sofrem danos estruturais e entram em apoptose. É evidente que a morte celular estimada pela coloração com Azul Tripan, a qual avalia somente se a membrana celular está íntegra, não é o parâmetro mais adequado para afirmar se determinadas células tem o potencial de colonizar túbulos. Nem mesmo o uso de kits de avaliação de apoptose ou cultivo *in vitro* desses tecidos podem esclarecer se determinado protocolo de vitricificação poderá ter sucesso ou não. Somente o transplante destas células e avaliação da formação de colônias e nascimento de animais provenientes de espermatozoides formados por essas colônias podem afirmar se determinado protocolo de vitricificação de tecido testicular é eficiente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Ao término deste trabalho foi possível concluir que os resultados encontrados comprovam a hipótese: a vitrificação de tecido testicular é uma metodologia de criopreservação de células-tronco espermatogoniais (SSCs) que pode garantir a formação de colônias após serem transplantadas para animais receptores. Pode-se afirmar isso, pois foi observada a formação de colônias de SSCs provenientes de testículos vitrificados com os dois protocolos estudados. No entanto, o primeiro protocolo apresentou resultados inferiores de viabilidade e concentração celular e também de número de colônias formadas em relação ao segundo protocolo.

O transplante de SSCs e avaliação da formação de colônias nos túbulos seminíferos é uma ferramenta muito válida para podermos aferir sobre o potencial de recuperação da fertilidade. No entanto, o que nos comprovará realmente se determinado protocolo de criopreservação foi eficaz será a obtenção do nascimento de uma prole originada de células do tecido testicular criopreservado.

Estudos comparando diferentes metodologias de criopreservação de tecido testicular em diferentes espécies, principalmente para a humana, são necessários para esclarecer dúvidas sobre a eficácia destas metodologias, tanto na viabilidade celular quanto integração das células transplantadas em animais receptores e posterior nascimento de uma linhagem proveniente deste procedimento.

Este foi o primeiro estudo a descrever a formação de colônias de células-tronco espermatogoniais provenientes de tecido testicular vitrificado nos túbulos seminíferos de testículos de animais receptores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIPOOR, F. J.; GILANI, M. A. S.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; HAMP, A. D.; HOSSEINIFAR, H.; ALIPOUR, H.; PANAH, M. L. Achieving high survival rate following cryopreservation after isolation of prepubertal mouse spermatogonial cells. **J Assist Reprod Genet**, v. 26, p. 143-149, 2009.

AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, C. J.; BRINSTER, R. L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. **Nat med**, v. 2, p. 693-696, 1996.

BELLVÉ, A. R.; CAVICCHIA, J. C.; MILLETTE, C. F.; BRIEN, D. A. O.; BHATNAGAR, Y. M.; DYM, M. SPERMATOGENIC CELLS OF THE PREPUBERAL MOUSE Isolation and morphological characterization. **J Cell Biol**, v. 74, p. 68-85, 1977.

BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proc Natl AcadSci**, v. 91, p. 11303-11307, 1994.

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

CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. **Am. J. Anat.**, v. 112, p. 35-51, 1963.

CURABA, M.; VERLEYSSEN, M.; AMORIM, C. A.; DOLMANS, M. M.; VAN LANGENDONCK, A.; HOVATTA, O.; WYNS, C.; DONNEZ, J. Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. **FertSteril**, v. 95, p. 1229-1234.e1, 2011.

DE ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. **Int J ExpPathol**, v. 79, n. 2, p. 67-80, 1998.

DE ROOIJ, D. G.; GROOTEGOED, J. A. Spermatogonial stem cells. **Cell Biol**, v. 10, p. 694-701, 1998.

DE ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J Androl**, v. 21, n. 6, p. 776-798, 2000.

DETTIN, L.; RAVINDRANATH, N.; HOFMANN, M. C.; DYM, M. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. **BiolReprod**, v. 69, p. 1565, 2003.

FREDERICKX, V.; MICHIELS, A.; GOOSSENS, E.; DE BLOCK, G.; VAN STEIRTEGHEM, A. C.; TOURNAYE, H. Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells. **Human Reprod**, v.19, n. 4, p. 948-953, 2004.

FUJIN SHEN; CI ZHANG; HONGYUN ZHENG; YUNHE XIONG; XI WANG; WENBIAO LIAO; XIANJIN DU; SIXING YANG; LINGLONG WANG. Long-term culture and transplantation of spermatogonial stem cells from BALB/c mice. **Cell Tissues Organs**, v. 191, p. 372-381, 2010.

FUJITA, K.; OHTA, H.; TSUJIMURA, A.; TAKAO, T.; MIYAGAWA, Y.; TAKADA, S.; MATSUMIYA, K.; WAKAYAMA, T.; OKUYAMA, A. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. **J Clin Invest**, v. 115, n. 7, p. 1855-1861, 2005.

GEENS, M.; VAN DE VELDE, H.; DE BLOCK, G.; GOOSSENS, E.; VAN STEIRTEGHEM, A.; TOURNAYE, H. The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. **Human Reprod**, v. 22, n. 3, p. 733-742, 2007.

GREEN, D.; GALVIN, H.; HORNE, B. The psycho-social impact of infertility on young male cancer survivors: a qualitative investigation. **Psychooncology**, v. 12, n 2, p. 141-52, 2003.

HERMANN, B. P.; SUKHWANI, M.; SALATI, J.; YI SHENG; TIANJIAO CHU; ORWIG, K. E. Separating spermatogonia from cancer cells in contaminated prepubertal primate testis cell suspensions. **Human Reprod**, v. 26, n. 12, p. 3222-3231, 2011.

HOLOCH, P.; WALD, M. Current options for preservation on fertility in the male. **FertSteril**, v. 96, p. 286-290, 2011.

HONARAMOOZ, A.; BEHBOODI, E.; MEGEE, S. O.; OVERTON, S. A.; GALANTINO-HOMER, H.; ECHELARD, Y.; DOBRINSK, I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. **BiolReprod**, v. 69, n. 4, p. 1260–1264, 2003.

HOWEEL, S.J.; SHALET, S.M. Testicular function following chemotherapy. **Human Reprod Update**, v. 7, n. 4, p. 363-369, 2001.

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. **Anat Rec**, v. 169, n. 3, p. 533-557, 1971.

IZADYAR, F.; SPIERENBERG, G.; CREEMERS, L.; OUDEN, K.; DE ROOIJ, D. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. **Reproduction**, v. 124, p. 85-94, 2002.

IZADYAR, F.; DEN OUDEN, K.; STOUT, T. A.; STOUT, J.; CORET, J.; LANKVELD, D. P.; SPOORMAKERS, T. J.; COLENBRANDER, B.; OLDENBROEK, J. K.; VAN DER PLOEG, K. D.; WOELDERS, H.; KAL, H. B.; DE ROOIJ, D. G. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. **Reproduction**, v.126, n. 6, p. 765-774, 2003.

JAHNUKAINEN, K.; MI HOU; PETERSEN, C.; SETCHELL, B.; SÖDER, O. Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia. **Cancer Res**, v. 61, p. 706-710, 2001.

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. **BiolReprod**, v. 69, p. 612-616, 2003.

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. **BiolReprod**, v. 72, p. 985-991, 2005.

KAOMEI GUAN; WOLF, F.; BECKER, A.; ENGEL W.; NAYERNIA K.; HASENFUSS G. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. **Nat Protoc**, v. 4, n. 2, p. 143-154, 2009.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. **Proc Natl AcadSci**, v. 101, p. 16489, 2004a.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. **BiolReprod**, v. 71, p. 722-731, 2004b.

LASS, A.; AKAGBOSU, F.; BRINDSEN, P. Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. **Human Reprod Update**, v. 7, n. 4, p. 370-377, 2001.

LAWSON, K. A.; PEDERSEN, R. A. Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. **Ciba Found Symp**, v. 165, p. 3-21; discussion 21-26, 1992.

LIN TANG; RODRIGUEZ-SOSA, J. R.; DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in mice. **J Vis Exp**, v. 6, n. 60, p. e3545, 2012.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; KERR, J. B.; KRETZER, D. M. Experimental cryptorchidism in the adult mouse: I. Qualitative and quantitative light microscopic morphology. **J Androl**, v. 11, n. 6, p. 539-547, 1990.

MIKKOLA, M.; SIRONEN, A.; KOPP, C.; TAPONEN, J.; SUKURA, A.; VILKKI, J.; KATILA, T.; ANDERSSON, M. Transplantation of a normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. **ReprodDomestAnim**, v. 41, n. 2, p. 124-128, 2006.

MINTZ, B.; RUSSELS, E.S. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. **J ExpZool**, v. 134, n. 2, p. 207-237, 1957.

NAGANO, M.; AVARBOCK, M. R.; LEONIDA, E. B.; BRINSTER, C. J.; BRINSTER, R. L. Culture of mouse spermatogonial stem cells. **Tissue Cell**, v. 30, n. 4, p. 389-397, 1998.

NAGANO, M.; BUOM-YONG RYU; BRINSTER, C. J.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. **BiolReprod**, v. 68, p. 2207-2214, 2003.

NAKAGAWA, T.; SHARMA, M.; NABESHIMA, Y.; BRAUN, R. E.; YOSHIDA, S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. **Science**, v. 328, p. 62-67, 2010.

OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 24, p. 263-286, 2008.

OGAWA, T.; ARECHAGA, J. M.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. **Int J Develop Biol**, v. 41, p. 111-122, 1997.

PERRARD, M.H.; SERENI, N.; SCHLUTH-BOLARD, C.; BLONDET, A.; D'ESTAING, S. G.; PLOTTON, I.; MOREL-JOURNEL, N.; LEJEUNE, H.; DAVID, L.; DURAND, P. Complete human and rat ex vivo spermatogenesis from fresh or frozen testicular tissue. **BiolReprod**, v. 95, n. 4, p. 1-10.

RADFORD, J. Restoration of fertility after treatment for cancer. **Horm Res**, v. 59, n. 1, p. 21-23, 2003.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG, E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Clearwater, FL.: Cache River Press, p.119-161, 1990.

SHEHATA, F.; RI-CHENG CHIAN. Cryopreservation of sperm: an overview. In: RI-CHENG CHIAN; QUINN, P. **FertilCryopres**. Cambridge: University Press, 2010. cap 5, p. 39-45.

SCHLATT, S.; FOPPIANI, L.; ROLF, C.; WEINBAUER, G. F.; NIESCHLAG, E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. **HumReprod**, v. 17, n. 1, p. 55-62, 2002.

SHINOHARA, T.; ORWIG, K. E.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. **Proc Natl AcadSci**, v. 97, n. 15, p. 8346-8351, 2000.

SHINOHARA, T.; ORWIG, K. E.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. **Proc Natl AcadSci**, v. 98, n. 11, p. 6186-6191, 2001.

SOK SIAM GOUK; YU FENG JASON LOH; KUMAR, S. D.; WATSON, P. F.; KULESHOVA, L. L. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. **FertilSteril**, v. 95, p. 2399-2403, 2011.

TEGELENBOSCH, R. A. J.; DE ROOIJ, D. G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. **Mutat Res/Fund MolecMechan Mutagen**, v. 290, p. 193-200, 1993.

VAN PELT, A.; MORENA, A. R.; VAN DISSEL-EMILIANI, 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. **BiolReprod**, v. 55, p. 439-444, 1996.

WHENZI MA; LEI AN; ZHONGHONG WU; XIAOYING WANG; MIN GOU; KAI MIAO; WEI MA; JIANHUITIAN. Efficient and safe recipient preparation for transplantation of mouse spermatogonial stem cells: pretreating testes with heat shock. **BiolReprod**, v. 85, n. 4, p. 670-677, 2011.

WITHERS, H. R.; HUNTER N.; BARKLEY JR., H. T.; REID, B. O. Radiation survival and regeneration characteristics of spermatogenic stem cells of mouse testis. **Radiation Res**, v. 57, n. 1, p. 88-103, 1974.

YINSHAN BAI; MEIYING FENG; SHANSHAN LIU; HENGXI WEI; LI LI; XIANWEI ZHANG; CHAO SHEN; SHOUQUAN ZHANG; NINGFANG MA. Differential gene expression in mouse spermatogonial stem cells and embryonic stem cells.**Int J Molec Med**, v. 38, p. 423-432, 2016.

ZHE YUAN; RUOYU HOU; JI WU. Generation of mice by transplantation of an adult spermatogonial cell line after cryopreservation.**CellProlip**, v. 42, p. 123-131, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+SAC 10%:

(Sok Siam Gouket *al.*, 2011).

- 1,35 ml de DMEM (GIBCO; cat: 11965-092).

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 0,15 ml de Etileno Glicol (SigmaE9129). Utilizar no dia.

APÊNDICEB – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+SAC17,5%:

- 1,235 ml de DMEM.

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 0,265 ml de Etileno Glicol. Utilizar no dia.

APÊNDICEC – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+SAC25%:

- 1,125 ml de DMEM.

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 0,375 ml de Etileno Glicol. Utilizar no dia.

APÊNDICED – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+SAC32,5%:

- 1,013ml de DMEM.
- 0,1540 g (0,3 mol/l) de Sacarose (SigmaS1888).

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 0,487 ml de Etileno Glicol. Utilizar no dia.

APÊNDICEE – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+SAC40%:

- 1,8 ml de DMEM.
- 0,6161 g (0,6 mol/l) de Sacarose.

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 1,2 ml de Etileno Glicol. Utilizar no dia.

APÊNDICEF – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+DMSO+BSA100%:

- 2,836 ml de DMEM.
- 0,1250 g de BSA (Sigma A9647).

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 1,2 ml (2,8 mol/l) de DMSO (Sigma D5879) e 0,984 ml (2,8 mol/l) de Etileno Glicol. Utilizar no dia.

APÊNDICEG – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+DMSO+BSA50%:

- 1ml de DMEM + 0,025 gde BSA.

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 1 ml de Meio de Vitrificação P2 100%. Utilizar no dia.

APÊNDICEH – MEIO DE VITRIFICAÇÃO EG+DMSO+BSA25%:

- 1,5 ml de DMEM + 0,375 gde BSA.

Filtrar (0,22 µm) e adicionar 0,5 ml de Meio de Vitrificação P2 100%. Utilizar no dia.

APÊNDICEI –MEIO DE DIGESTÃO 1:

- 5 ml DMEM.
- 0,0178 g (15 mM) de HEPES (SigmaH6147).
- 0,0050 g de Colagenase tipo IV (SigmaC5138).
- 250 µg de DNaseI (SigmaD5025).
- 500 UI/500 µg de Penicilina/Streptomicina.

Filtrar (0,22 µm). Utilizar no dia.

APÊNDICEJ – SOLUÇÃO ESTOQUE EDTA 10 mM:

- 10 ml de DMEM.
- 0,0372 g de EDTA (SigmaE5134).

Filtrar (0,22 µm). Dividir em alíquotas de 0,5 ml. Armazenar a -20°C. Tempo para uso indeterminado.

Para preparar 2 ml de meio de digestão usar 0,2 ml da alíquota.

Para preparar 5 ml de meio de digestão usar 0,5 ml da alíquota.

A concentração final será de 1 mM por ml.

APÊNDICEK – SOLUÇÃO ESTOQUE DE TRIPSINA 2,5%:

- 5 ml de DMEM.
- 0,1750 g de Tripsina GIBCO (1:250; cat: 27250-018).

Filtrar (0,22 µm). Dividir em alíquotas de 0,5 ml. Armazenar a -20°C. Tempo para uso indeterminado.

Para preparar 2 ml de meio de digestão usar 0,2 ml.

Para preparar 5 ml de meio de digestão usar 0,5 ml.

A concentração final será de 0,25%.

APÊNDICEL –MEIO DE DIGESTÃO 2:

- 5 ml DMEM.
- 0,0178 g (15 mM) de HEPES.
- 0,5 ml de tripsina 2,5%.
- 0,5 ml de EDTA 10 mM.
- 250 µg de DNaseI.

Filtrar (0,22 µm). Utilizar no dia.

APÊNDICEM – BUSULFAN:

- 23,33 mg de Busulfan (Sigma B2635).
- 2,5 ml de DMSO.
- 2,5 ml de água destilada estéril.

Transferir o busulfan para um tubo estéril de 15 ml protegido por papel alumínio.

Adicionar o DMSO e homogeneizar até completa dissolução.

Adicionar a água destilada estéril.

Transferir para um frasco protegido da luz com tampa de borracha.

Concentração final: 4,66 mg/ml. Dose: 50 mg/kg de peso do animal.

Aquecer o frasco a 37°C antes da aplicação.

APÊNDICEN

Imagens de túbulos seminíferos de camundongo da linhagem C57BL6 que recebeu transplante de células-tronco espermatogoniais provenientes de camundongo da linhagem C57BL6 GFP+. No canto superior à esquerda túbulos seminíferos em campo escuro sob ação de luz ultravioleta (filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 600 nm) com magnificação de 100x e no canto superior direito com magnificação de 200x. No canto inferior esquerdo e inferior direito, imagens com magnificação de 100x e 200x, respectivamente, dos mesmos campos de visualização das imagens superiores, porém sem o uso da luz ultravioleta.

Fonte: WORST, R. A. (2016).

APÊNDICE O

Imagens de etapas desenvolvidas neste estudo. A figura A representa o tamanho aproximado de testículos de camundongos com idade entre 8 a 10 dias. A figura B está demonstrando testículos que passaram pela desidratação do Protocolo EG+Sac e foram envasados para serem introduzidos no nitrogênio líquido. Pode-se observar a presença de dois testículos na palheta. A figura C está demonstrando fragmentos de testículos que passaram pela desidratação do Protocolo EG+DMSO+BSA e foram envasados para serem introduzidos no nitrogênio líquido. Pode-se observar a presença de quatro fragmentos na palheta. A figura D representa o tamanho dos testículos de camundongos com 10 semanas, sendo que o menor testículo é proveniente de um animal tratado com busulfan e o maior testículo de animal não tratado. A figura E apresenta o campo de visão com magnificação de 20x de testículo de animal receptor, evidenciando os ductos eferentes dissecados e prontos para ser realizado o transplante de SSCs. A figura F apresenta o campo de visão com magnificação de 40x de testículo submetido ao transplante de SSCs, evidenciando o preenchimento dos túbulos seminíferos com a suspensão de células com o corante Azul Tripán.

Fonte: WORST, R. A. (2016).