ROBINSON ANDRÉ WORST

Influência da expressão da alfa-6 integrina na produção de células-tronco espermatogoniais murinas transgênicas

São Paulo

2012

ROBINSON ANDRÉ WORST

Influência da expressão da alfa-6 integrina na produção de células-tronco espermatogoniais murinas transgênicas

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Visintin

De acordo:_____

Orientador

São Paulo

2012

VERSÃO CORRIGIDA

Obs.: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2684
FMVZ

Worst, Robinson André
Influência da expressão da alfa-6 integrina na produção de células-tronco espermatogoniais murinas transgênicas / Robinson André Worst. -- 2012.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Visintin.

1. Células-tronco espermatogoniais. 2. Murinos. 3. Transgenia Animal. 4. Alfa-6 integrina
I. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da expressão da alfa-6 integrina na produção de SSC murinas transgênicas", protocolado sob o nº 1957/2010, utilizando 140 (cento e quarenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Visintin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/5/2012.

We certify that the Research "Influence of expression of alpha-6 integrin in the production of transgenic murines SSC", protocol number 1957/2010, utilizing 140 (one hundred forty) mice, under the responsibility Prof. Dr. José Antonio Visintin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/16/2012.

São Paulo, 12 de julho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WORST, Robinson André

Título: Influência da expressão da alfa-6 integrina na produção de células-tronco espermatogoniais murinas transgênicas

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A Deus.

Ao meu pai, Wilson e minha mãe, Valdemira.

À minha irmã, Michele.

“Like a true nature’s child

We were born, born to be wild

We can climb so high

I never want to die

Born to be wild…”

(Steppenwolf)

Agradecimentos

Nesse momento é difícil lembrar-se de todas as pessoas que fizeram parte e que, de qualquer forma, colaboraram para que eu finalmente concretizasse mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Para não correr o risco de esquecer ninguém, o melhor é agradecer a estas pelos acontecimentos em uma ordem cronológica...

A primeira pessoa que devo agradecer é a Profª Mayra! Afinal, se ela não tivesse aceitado o meu pedido de estágio em 2009 seria difícil um dia fazer parte desse grupo. Obrigado Mayra! Obrigado pela oportunidade, atenção, compreensão e, acima de tudo, pelos ensinamentos! Aprendi muito com a senhora e saiba que é um grande exemplo para mim.

Obrigado a Rê!! É! Tu me instruíste indicando-me um lugar para morar aqui em São Paulo, me passando os melhores caminhos para chegar ao meu destino e conseguindo de forma rápida facilitar a minha viagem pra Espanha! Obrigado pela amizade e pelas risadas que tornaram meus dias mais agradáveis!

Ah! Agora minha “co-co-orientadora”! Flavia! Tu me supervisionaste desde o meu estágio até esses últimos dias. Tu és muito inteligente guria! Eu estaria totalmente perdido se não tivesse tu por perto e a “Equipe SSC”. Valeu!

A Camilla me deu o primeiro incentivo naquele dia, sentados em frente ao fluxo, quando me disse “Vai lá! Conversa com ele!”, me instruindo como poderia pedir ao Prof. Visintin uma oportunidade para fazer o mestrado. Camilla! Todo mundo deve te perguntar isso: “Como tu consegue??”. Tu estás sempre presente quando alguém precisa. Para qualquer coisa. Obrigado também pelos ensinamentos sobre bioterismo! Hoje me considero um profissional também nessa área graças a ti.

Calma Visintin! Calma era o que nos faltava naquela manhã de sábado quando fui conversar com o senhor pedindo para me orientar no mestrado. Não sei quem estava mais nervoso! Obrigado pela oportunidade! Sei que lhe decepcionei muitas vezes e peço desculpas por isso. JAV! Emocionei-me também com o seu poder de liderança! O senhor é um grande profissional e uma pessoa incrível!

Não poderia deixar de agradecer à “Equipe SSC”: Giana, Giassetti, Alexandre, Pedro e, à mais nova contratação, Marcelo!

“Chuchu Giana”! Valeu pela amizade, pelas fofocas, confissões e, é claro, por ter me ensinado a “pegar os testículos”!

A Mariana Giassetti foi contagiada pela nossa equipe e foi um grande reforço! Valeu pela amizade e ensinamentos.

Alexandre (Pacato) e Pedro (Jaburuh)! Eu espero que continuem conosco! Obrigado pela amizade!

Bah! Se havia alguém que deveria ter entrado para a equipe antes é o Marcelo (Febém)! Cara! Já haviam me falado que tu és muito inteligente, mas não imaginava que tanto! Valeu pela força nesses últimos dias!

Aos que infelizmente já se despediram do VRA obrigado e espero o retorno de vocês! Valeu pela amizade Fernanda, Éverton, José Sérgio (Zeca), Mariana (Xum), Mari Groke, Paulo, Pedro, Rafaela e Samir.

Obrigado aos demais amigos e colegas que ainda estão presentes e alegram o ambiente! Adriano, Julia, Thais, Letícia, Patrícia e Juliana.

Já passei por vários lugares, mas somente aqui no VRA pude perceber a quão unida é essa família! Muito obrigado pelo convívio, amizade e ensinamentos de todos os professores, colegas e funcionários.

Eu gostaria de agradecer também a colaboração de professores externos. Ao Prof. Dr. Bryan Strauss e à Profª Dra. Mari Sogayar.

Muito obrigado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Universidade de São Paulo, que me acolheram muito bem!

Muito obrigado à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro que sem o qual seria inviável minha permanência em São Paulo e a conclusão desta dissertação de mestrado.

Aos membros da banca, professores Ricardo Bertolla, Ricardo Pereira, Heloísa Caetano, Camilla Mendes e Marcelo Goissis, pela disponibilidade de vocês e possíveis correções desta dissertação. Muito obrigado!

E por último, mas não menos importante, agradecer à minha namorada, companheira e amiga Stéfany. Tu foste e ainda és muito importante para mim, me ensinou algo que não havia aprendido: amar outra pessoa, que não da nossa família. Obrigado!

RESUMO

WORST, R. A. **Influência da expressão da alfa-6 integrina na produção de células-tronco espermatogoniais murinas transgênicas.** [Influence expression of integrin alpha-6 in the production of transgenic murine spermatogonial stem cells]. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Ao longo da vida reprodutiva dos machos adultos, 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 transgenia, no entanto os protocolos requerem a adição de fatores de crescimento, o que encarece a manutenção dessas células por um tempo prolongado, fazendo da criopreservação de SSCs uma alternativa para esse problema. O fenótipo molecular de células-tronco espermatogoniais tem sido objeto de estudo nas últimas décadas. Uma das moléculas mais estudadas como marcador na caracterização de espermatogônias é a alfa-6 integrina. Baseado nestas informações, a seguinte hipótese foi proposta: SSCs que apresentam maior expressão de alfa-6 integrina são mais eficientes para modificações genéticas e colonização de túbulos seminíferos. Para testar essa hipótese, as SSCs murinas foram dissociadas de testículos de camundongos com 8 a 11 dias de idade. Essas células foram cultivadas *in vitro*, caracterizadas quanto sua morfologia, congeladas e incubadas com anticorpo anti-alfa-6 integrina para a purificação das SSCs por separação celular ativada por fluorescência (FACS). Células testiculares foram geneticamente modificadas com a inserção do gene marcador LacZ e o transplante através dos ductos eferentes foi padronizado. As Células germinativas testiculares foram dissociadas e cultivadas *in vitro*, porém a viabilidade foi aquém da desejada, inviabilizando as etapas de transformação, transplante e posterior avaliação histológica. Usando o marcador molecular alfa-6 integrina foi possível separar populações de células germinativas testiculares por FACS e a expressão gênica de ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1 foi detectada por RT-PCR quantitativo. Em conclusão, não foi possível comprovar a eficiência de transdução e colonização em túbulos seminíferos por células-tronco espermatogoniais selecionadas com alfa-6 integrina.

Palavras-chave: Células-tronco espermatogoniais. Camundongos. Transgenia Animal. Alfa-6 integrina.

ABSTRACT

WORST, R. A. **Influence expression of integrin alpha-6 in the production of transgenic murine spermatogonial stem cells.** [Influência de expressão da alfa-6 integrina na produção de células-tronco espermatogoniais murinas transgênicas]. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Throughout the reproductive life of adult males, spermatozoa are formed from spermatogonial stem cells (SSCs) by a process known as spermatogenesis. The *in vitro* culture of SSCs created new possibilities for transgenesis, however the protocols require addition of growth factors, which increases the maintenance costs of these cells for a prolonged time, making of the cryopreservation of SSCs an alternative for this problem. The molecular phenotype of spermatogonial stem cells have been target of studies in recent decades. One of the most studied marker molecule in the characterization of spermatogonia is integrin alpha-6. Based on these informations, the following hypothesis was proposed: SSCs that show increased expression of integrin alpha-6 are more efficient for genetic modification and colonization of seminiferous tubules. In order to test this hypotesis, murine SSCs were dissociated from testes of 8 to 11 days old mice. These cells were *in vitro* cultured, characterized based on its morphology, frozen and incubated with anti-integrin alpha-6 antibody for the purification of SSCs by activated cell sorting fluorescence (FACS). Testicular cells were genetically modified with the insertion of the marker gene LacZ and transplantation through the efferent ducts was standardized. The testicular germ cells were dissociated and *in vitro* cultured, however viability was below expected, precluding the steps of transformation, transplantation and subsequent histological evaluation. Using molecular marker integrin alpha-6 it was possible to separate testicular germ cell populations by FACS and gene expression of ITGα6, GFRα1, Oct-4 and Thy-1was detected by quantitative RT-PCR. In conclusion, it was not possible to prove the efficiency of transduction and colonization in the seminiferous tubules by spermatogonial stem cells selected with alpha 6 integrin.

Key-words: Spermatogonial stem cells. Mice. Animal transgenesis. Integrin alpha-6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de um túbulo seminífero de camundongo demonstrando a membrana basal e a posição das células espermatogoniais em relação à mesma.....23

Figura 2 – Esquema da autorrenovação e multiplicação de células-tronco espermatogoniais em murinos.....25

Figura 3 – Fotomicrografia representativa de células testiculares de filhotes de camundongos após digestão enzimática obtida por microscopia invertida de contraste diferencial de fase (magnificação de 400 x).....40

Figura 4 – Fotomicrografia representativa de células testiculares de filhotes de camundongos após plaqueamento diferencial, obtida por microscopia invertida de contraste diferencial de fase (magnificação de 200 x). Células da linhagem germinativa de diversos tamanhos (setas azuis) e célula aderida do parênquima testicular (seta vermelha).....41

Figura 5 – Expressão de alfa-6 integrina em células germinativas testiculares murinas avaliadas por FACS. Eixo “y”: complexidade celular (*side scatter-SSC-A*). Eixo “x”: intensidade de marcação com alfa-6 integrina (*FITC-A*). Em (A) controle negativo para a reação e em (C) amostra incubada com anticorpo anti-alfa-6 integrina. Em (B) e (D) histograma representando o controle negativo e a amostra incubada com anticorpo, respectivamente. P4 representa a população de células negativas e P3 representa a população de células positivas para alfa-6 integrina, que também corresponde ao P2. 52

Figura 6 – Expressão relativa dos genes ITGα6, Thy-1, GFRα1 e Oct-4 em células germinativas testiculares de filhotes de camundongos avaliada por RT-PCR quantitativo 54

Figura 7 – Fotomicrografia representativa de células espermatogoniais após transformação com vetor lentiviral LV-LacZ e coloração com corante X-gal. Em (A) e (C) células espermatogoniais murinas expressando beta-galactosidase (coradas em azul). Em (B) controle negativo e (C) célula espermatogonial murina que não expressa beta-galactosidase (não corada em azul). Magnificação de 400 x 60

Figura 8 – Fotografia de testículos murinos após injeção do corante azul de tripan. Em (A) observa-se acima o testículo, abaixo o epidídimo e os ductos eferentes isolados. Em (B), após a injeção com azul de tripan, aproximadamente 70% dos túbulos seminíferos preenchidos. Em (C) camundongo após injeção nos dois testículos. Em (D), após uma semana, observa-se que o corante preencheu a cabeça do epidídimo e a ausência de aderências 61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo das manipulações realizadas para isolamento de células testiculares murinas.....39

Quadro 2 – Resultados obtidos após o plaqueamento diferencial 41

Quadro 3 – Porcentagem de células viáveis obtida após a descongelação.....42

Quadro 4 – Viabilidade obtida após 48 horas de cultivo *in vitro*.....42

Quadro 5 – Sequências de oligonucleotídeos utilizadas dos genes alvo ITGα6, GFRα1, Oct-4, Thy-1 e dos genes constitutivos (controle endógeno) ACTB e GAPDH.....50

Quadro 6 – Porcentagem total da população de células positivas e negativas para expressão de alfa-6 integrina em diferentes rotinas de FACS (considerando 10.000 eventos) 51

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Expressão relativa de ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1 em células germinativas testiculares murinas após separação celular ativada por fluorescência - FACS - São Paulo - 2012 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{al}	Célula-tronco espermatogonial do tipo A alinhada
ACTB	Beta actina (gene)
A_{pr}	Célula-tronco espermatogonial do tipo A pareada
A_s	Célula-tronco espermatogonial do tipo A simples
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico, do inglês *basic fibroblast growth factor*
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar, do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*
CSF1	Fator estimulador de colônia 1, do inglês *colony stimulating factor 1*)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
FACS	Separação celular ativada por fluorescência, do inglês *fluorescence-activated cell sorting*
FCS	Soro fetal bovino, do inglês *fetal calf serum*
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês *fluorescein isothiocyanate*
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, do inglês *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia, do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*
GFRα1	Receptor alfa-1 da família GDNF, do inglês *GDNF family receptor alpha 1* (gene)
ITGα6	Alfa-6 integrina (gene)
LacZ	LacZ (gene)
MACS	Separação celular ativada magneticamente, do inglês *magnetic-activated cell sorting*

MEF	Fibroblastos fetais murinos, do inglês *murine embryonic fibroblasts*
MOI	Multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*
Oct-4	Oct-4 (gene)
PBS	Solução tampão de fosfato, do inglês *phosphate buffer solution*
PGCs	Células germinativas primordiais, do inglês *primordial germ cells*
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*
RT-PCR	Transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase, do inglês *reverse transcriptase-polimerase chain reaction*
SCF	Fator de célula-tronco, do inglês *stem cell factor*
SEM	Erro padrão da média, do inglês *standard error of the mean*
SMGT	Transferência gênica mediada por espermatozoides, do inglês *Sperm mediated gene transfer*
SSC	Célula-tronco espermatogonial, do inglês *spermatogonial stem cell*
SSCs	Células-tronco espermatogoniais, do inglês *spermatogonial stem cells*
Thy-1	Thy-1 (gene)
TMGT	Transferência gênica mediada pelo testículo, do inglês *testis-mediated gene transfer*
W/W	Homozigose dominante para o locus gênico *white spotting*

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de carbono
x g	Força de centrifugação em g (gravidade)
g	Grama (s)
°C	Graus Celsius
Ca^{2+}	Íon Cálcio
Mg^{2+}	Íon Magnésio
®	Marca Registrada
µL	Microlitro
nM	Nanomolar
“n”	número
Nº	número
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
±	Para mais e para menos
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
p	Probabilidade estatística
(v/v)	Razão entre dois volumes (dada em porcentagem)
(m/v)	Razão entre massa e volume (dada em porcentagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DE LITERATURA.....23

2.1 CÉLULAS-TRONCO ESPERMATOGONIAIS 23

2.2 DIVISÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS SSCs 24

2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SSCs.....26

2.4 ISOLAMENTO E ENRIQUECIMENTO DE SSCs.....27

2.5 CULTIVO *IN VITRO* DE SSCs 28

2.6 TRANSPLANTE E CRIOPRESERVAÇÃO DE SSCs.....29

2.7 USO DE SSCs NA TRANSGENIA ANIMAL 31

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....33

CAPÍTULO 1: Dissociação e criopreservação de células germinativas testiculares de filhotes murinos.....35

4 MATERIAIS E MÉTODOS 35

4.1 DISSOCIAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES DE FILHOTES MURINOS 35

4.2 PLAQUEAMENTO DIFERENCIAL.....36

4.3 CONGELAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES.....37

4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-CULTIVO *IN VITRO* 37

4.5 DESCONGELAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAÇÃO 38

5 RESULTADOS.....39

5.1 DISSOCIAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES DE FILHOTES MURINOS 39

5.2 PLAQUEAMENTO DIFERENCIAL.....40

5.3 DESCONGELAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAÇÃO 42

5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-CULTIVO *IN VITRO* 42

6 DISCUSSÃO 43

CAPÍTULO 2: Separação celular ativada por fluorescência de células germinativas testiculares de filhotes murinos 47

7 MATERIAIS E MÉTODOS 47

7.1 INCUBAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES COM ANTICORPO ANTI-ALFA-6 INTEGRINA 47

7.2 SEPARAÇÃO CELULAR ATIVADA POR FLUORESCÊNCIA (FACS) 48

7.3 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES ITGα6, GFRα1, OCT-4 E THY-1 EM CÉLULAS ESPERMATOGONIAIS APÓS FACS 49

8 RESULTADOS 51

8.1 SEPARAÇÃO CELULAR ATIVADA POR FLUORESCÊNCIA 51

8.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES ITGα6, GFRα1, OCT-4 E THY-1 EM CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES APÓS FACS 52

9 DISCUSSÃO 55

CAPÍTULO 3: Padronização das técnicas de transformação e transplante de células testiculares de filhotes murinos 58

10 MATERIAIS E MÉTODOS 58

11 RESULTADOS 60

12 DISCUSSÃO 62

13 CONCLUSÕES 65

REFERÊNCIAS 67

ANEXOS 76

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da vida reprodutiva dos machos adultos, espermatozoides são formados pelas células-tronco espermatogoniais (SSC, do inglês s*permatogonial stem cells*) por um processo conhecido como espermatogênese. Uma única SSC, após várias divisões mitóticas e meióticas, pode dar origem a 2048 ou 4096 espermatozoides. Além disso, as células-tronco espermatogoniais possuem capacidade de autorrenovação e replicação durante toda a vida e são as únicas células-tronco em adultos capazes de transmitir informações genéticas para a próxima geração (KUBOTA; BRINSTER, 2006).

O fenótipo molecular de células-tronco espermatogoniais tem sido objeto de estudo nas últimas décadas. Através da combinação de técnicas de separação celular por meio de moléculas presentes na superfície celular tem-se obtido um grande avanço nessa área. Uma das moléculas mais estudadas como marcador na caracterização de espermatogônias é a alfa-6 integrina (SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER, 1999; KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2003). 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 o enriquecimento da população de células-tronco espermatogoniais com base em características como o tamanho e moléculas de superfície das células.

O primeiro relato de sucesso na recuperação da fertilidade após criopreservação e transplante de células-tronco espermatogoniais foi descrito por Avarbock, Brinster e Brinster (1996). Atualmente, os protocolos de cultivo *in vitro* de SSCs requerem a adição de fatores de crescimento e, no caso da aplicação na recuperação de fertilidade de pacientes submetidos à quimioterapia, haveria a exigência de um cultivo in vitro prolongado, portanto, a manutenção dessas células acaba tornando-se um processo custoso, sem considerar o risco de contaminações. Uma alternativa para redução de custos com o cultivo *in vitro* é a criopreservação dessas células.

Desde o momento em que células-tronco germinativas puderam ser manipuladas *in vitro* e produzir nascimentos, os recentes avanços das técnicas de

cultivo abriram novas possibilidades para a transgenia utilizando células da linhagem germinativa. Com essas informações, este projeto de pesquisa pretendeu estabelecer o cultivo e a modificação de SSC murinas para produção de animais transgênicos. Para chegar a este objetivo, em uma primeira etapa foram isoladas células espermatogoniais murinas de filhotes com idade entre 8 e 11 dias, mantidas em cultivo *in vitro* e após criopreservadas. Posteriormente, a seleção de células que apresentam marcação para alfa-6 integrina foi realizada por citometria de fluxo e marcadores moleculares de SSCs identificados por RT-PCR quantitativo. Ao final, a transformação de células espermatogoniais com o gene marcador LacZ foi relatada e padronizou-se a técnica de transplante de células espermatogoniais.

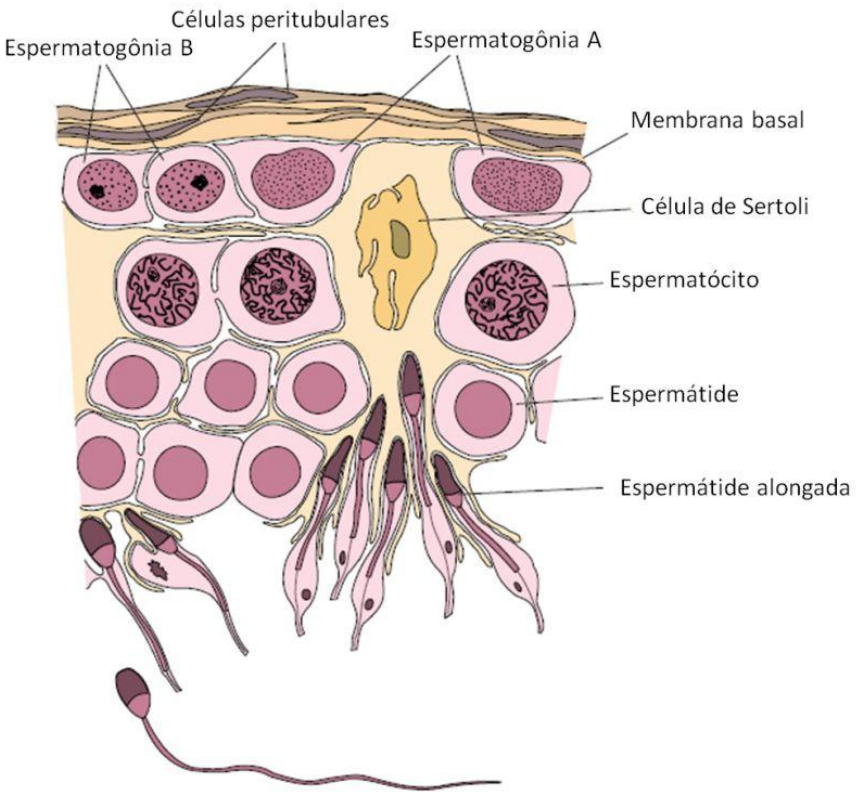
REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO ESPERMATOGONIAIS

Ao longo da vida reprodutiva dos machos adultos, espermatozoides são formados pelas células-tronco espermatogoniais (SSCs, do inglês s*permatogonial stem cells*) por um processo conhecido como espermatogênese (DE ROOIJ; RUSSELL, 2000). De Rooij e Mizrak (2008) citam que as SSCs residem na membrana basal dos túbulos seminíferos e são células únicas (Figura 1).

Figura 1 – Esquema de um túbulo seminífero de camundongo demonstrando a membrana basal e a posição das células espermatogoniais em relação à mesma



Fonte: adaptado de (DE ROOIJ; MIZRAK, 2008).

A origem das SSCs se dá pelas suas células precursoras, as células germinativas primordiais (PGCs, do inglês *primordial germ cells*) durante os primeiros estágios da vida embrionária (LAWSON; PEDERSEN, 1992). 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 serem chamadas de gonócitos (CLERMONT; PEREY, 1957). Em camundongos, aproximadamente no terceiro dia após o nascimento os gonócitos que estão quiescentes começam a se diferenciar e ao sexto dia de vida tornam-se SSCs (BELLVÉ et al., 1977).

Como já comentado, as SSCs apresentam uma grande contribuição para a espermatogênese. Russel et al. (1990) citam que uma única SSC, após várias divisões mitóticas e meiótica, pode dar origem a 2048 ou 4096 espermatozoides. Além disso, as células-tronco espermatogoniais possuem capacidade de autorrenovação e replicação durante toda a vida e são as únicas células-tronco em adultos capazes de transmitir informações genéticas para a próxima geração (KUBOTA; BRINSTER, 2006).

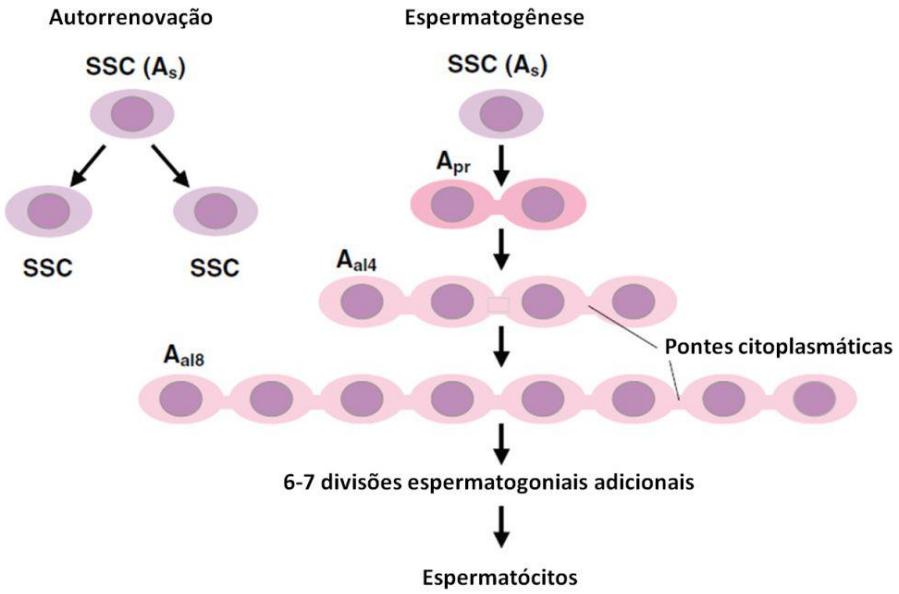
2.2 DIVISÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS SSCs

Quando uma célula-tronco espermatogonial começa a se dividir ela pode decidir por dois caminhos distintos: a autorrenovação ou a produção de espermatozoides. Ainda são desconhecidos os mecanismos que fazem com que uma SSC siga uma ou a outra via e também não se sabe ao certo se elas dividem-se de uma forma simétrica ou 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).

O modelo para classificação de células-tronco espermatogoniais, conhecido como modelo A_s é o mais aceito (HUCKINS, 1971a). Em ratos adultos sete tipos de

espermatogônias tipo A foram classificados: $A_{simples}$ (A_s), $A_{pareada}$ (A_{pr}), $A_{alinhada}$ (A_{al}), A_1, A_2, A_3 e A_4 (HUCKINS, 1971a). 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 darão origem às demais células da linhagem germinativa (Figura 2) (DE ROOIJ; GROOTEGOED, 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 et al. (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.

Figura 2 – Esquema da autorrenovação e multiplicação de células-tronco espermatogoniais em murinos



Fonte: adaptado de (DE ROOIJ; MIZRAK, 2008).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SSCs

O fenótipo molecular de células-tronco espermatogoniais tem sido objeto de estudo nas últimas décadas. Um grande avanço nessa área tem sido obtido através da combinação de técnicas de separação celular por meio de moléculas presentes na superfície celular. Uma das moléculas mais estudadas como marcador na caracterização de espermatogônias é a alfa-6 integrina (SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER, 1999; KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2003). Sabe-se que integrinas são moléculas presentes na superfície da membrana celular e que podem atuar como receptores de adesão celular (HYNES, 1992). A primeira vez que foi citada como marcador de espermatogônias, em ratos, foi em 1995 por Salanova et al. Em 1999, Shinohara, Avarbock e Brinster demonstraram que espermatogônias com marcação para estas integrinas de superfície produziram populações celulares com significante habilidade de colonizar testículos de receptores e esta colonização foi duas vezes mais efetiva com células selecionadas para alfa-6 integrina. Desde então, a alfa-6 integrina tem sido estudada como marcador para células espermatogoniais em suínos (KUIJK; COLENBRANDER; ROELEN, 2009), humanos (IZADYAR et al., 2011) e bovinos (DE BARROS et al., 2012).

Nos túbulos seminíferos, além das integrinas desempenharem papel de adesão de SSCs, as células de Sertoli também ajudam na sustentação das SSCs. Trupp et al. (1995) sugeriram pela primeira vez que as células de Sertoli poderiam produzir GDNF (do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*) e que este poderia ter efeito nos estágios iniciais da espermatogênese. Em 2003, Yomogida et al. comprovaram a expansão *in vitro* de SSCs pela expressão de GDNF por células de Sertoli e seu receptor alfa-1 da família do GDNF (GFRα-1, do inglês *GDNF family receptor alpha-1*) tem sido usado como marcador de células-tronco espermatogoniais (BUAGEAW et al., 2005).

Existem ainda outras proteínas que podem ser utilizadas como marcadores de SSCs. O Oct-4 pertence à classe V das POU (Pit-Oct-Unc), família de fatores de transcrição (RYAN; ROSENFELD, 1997). Esse fator de transcrição é um marcador de pluripotência e está relacionado à determinação da linhagem germinativa em mamíferos (PESCE; SCHÖLER, 2000). Outro fator de transcrição associado à

caracterização de células-tronco espermatogoniais é o Thy-1, ou CD90 (KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2003). O Thy-1 é uma glicoproteína ancorada de glicosil fosfatidilinositol da superfamília de imunoglobulinas que é expressa em células-tronco hematopoiéticas (SPANGRUDE; HEIMFELD; WEISSMAN, 1988).

2.4 ISOLAMENTO E ENRIQUECIMENTO DE SSCs

No camundongo adulto, somente cerca de 0,03% das células germinativas são SSC (TEGELENBOSCH; DE ROOIJ, 1993). A população absoluta de células-tronco espermatogoniais isoladas de camundongos adultos criptorquidas é 39 e 6 vezes maior em relação a neonatos e filhotes, respectivamente. No entanto, as colônias formadas por SSCs de neonatos e a quantidade de células isoladas por grama de testículo são maiores (SHINORAHA et al., 2001). 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.

A escolha do protocolo adotado, tanto para o isolamento das células germinativas testiculares quanto para o enriquecimento das SSC, é outro fator importante na obtenção das SSCs. Bellvé et al. (1977) propuseram uma digestão enzimática do parênquima testicular em dois passos. Em 1996, van Pelt et al. realizaram algumas modificações, incubando os túbulos seminíferos dissecados com solução contendo hialuronidase, tripsina, colagenase e DNase e obtiveram bons resultados no isolamento de células germinativas. Para aperfeiçoar os protocolos de isolamento, Fujin Shen et al. (2010) propuseram uma digestão modificada que consistia na digestão durante 3 a 5 minutos em solução de colagenase e DNase com agitação suave e após, nova digestão por 4 a 5 minutos em solução de colagenase, DNase e hialuronidase com aspiração vigorosa. Com esse protocolo, eles reduziram o tempo da digestão e incrementaram o número de SSCs obtidas sem comprometer a viabilidade.

Além da obtenção de quantidade suficiente de células com uma boa viabilidade, o sucesso do cultivo *in vitro* de SSCs depende posteriormente de seu enriquecimento. Para este, existem várias técnicas já testadas. A seleção das

células murinas isoladas em um gradiente descontínuo de Percoll® foi descrita por van Pelt et al. (1996). O plaqueamento diferencial (IZADYAR et al., 2002) consiste em cultivar *in vitro* em placas todas as células isoladas após a digestão por um período de aproximadamente 16 horas. As células da linhagem germinativa ficam em suspensão e são transferidas para outra placa. 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 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).

2.5 CULTIVO *IN VITRO* DE SSCs

A criação de sistemas de cultivo que suportam a autorrenovação da expansão do número de SSCs por períodos extensos de tempo foi alcançada na última década. Kanatsu-Shinohara et al. (2005) desenvolveram 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), atuando de forma parácrina nas células espermatogoniais (XIAOJUAN MENG et al., 2000). 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) e o fator 1 estimulador de colônia (CSF1, do inglês *colony stimulating factor 1*) (OATLEY et al., 2009). 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).

2.6 TRANSPLANTE E CRIOPRESERVAÇÃO DE SSCs

A melhor maneira para se verificar a preservação da capacidade das SSCs em restabelecer a espermatogênese *in vivo* é realizando o transplante 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; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; ZHE YUAN; RUOYU HOU; JI WU, 2009; BANG-JIN KIM et al., 2012). Para o transplante é necessário que os animais receptores tenham 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, lócus gênico *white spotting*, os quais não apresentam espermatogênese (MINTZ; RUSSELS, 1957) e o choque térmico (WHENZI MA et al., 2011). Ogawa et al. (1997) descrevem perfeitamente as principais metodologias para o transplante de células-tronco espermatogoniais, que

são através dos ductos eferentes, pela *rete testis* 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 da "pureza" da solução injetada, ou seja, do número de células-tronco espermatogoniais injetadas. As técnicas de FACS e MACS têm contribuído muito para isso. Pela separação por meio de marcadores moleculares descritos em SSCs altas taxas de colonização têm sido obtidas (SHINOHARA et al., 2000). O transplante e a purificação de SSCs mostra-se como uma das etapas mais 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 et al. (2001). Para isso, estudos têm sido realizados apresentando resultados promissores (FUJITA et al., 2005; HERMANN et al., 2011).

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. Os protocolos de congelação lenta utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como crioprotetor são os mais estudados (ALIPOOR et al., 2009; ZHE YUAN; RUOYU HOU; JI WU, 2009). Frederickx et al. (2004) compararam protocolos de congelação lenta controlada e não controlada,

utilizando como crioprotetores tanto DMSO quanto EG (etilenoglicol). Outra metodologia quem tem sido estudada é a vitrificação e tem apresentado ótimos resultados (SOK SIAM GOUK et al., 2011).

2.7 USO DE SSCs NA TRANSGENIA ANIMAL

Os recentes avanços das técnicas de cultivo *in vitro* abriram novas possibilidades tanto pelo seu potencial biomédico quanto pelo seu uso na biotecnologia animal. Pesquisas desenvolvidas na área de transgenia fazem uso das SSCs, pois estas apresentam um grande potencial para a produção de animais transgênicos (BRINSTER; AVARBOCK, 1994). Por exemplo, machos que receberam transplante de células-tronco espermatogoniais modificadas poderão produzir milhões de espermatozoides com o gene de interesse maximizando e diminuindo os custos da técnica de transgenia.

Atualmente uma das principais técnicas no campo da transgenia animal é a transferência gênica mediada por espermatozoides (SMGT, do inglês *sperm-mediated gene transfer*) (GANDOLFI, 1998). Nessa técnica, espermatozoides são incubados *in vitro* com vetores que internalizam o DNA de interesse. Após, os espermatozoides podem ser utilizados na fertilização *in vitro* de oócitos (MAIONE et al., 1998). No entanto, os protocolos desenvolvidos para essa técnica são difíceis de reproduzir além de apresentam resultados instáveis. Nesse sentido, uma alternativa que surgiu foi a transferência gênica mediada pelo testículo (TMGT, do inglês *testis-mediated gene transfer*) (SATO et al., 1994), que consiste em modificar geneticamente as SSCs, precursoras dos espermatozoides. Para a geração de SSCs transgênicas, o uso de vetores lentivirais tem sido empregado com bastante êxito, tanto *in vitro* (NAGANO et al., 2002; BUOM-YONG RYU et al., 2007; BANG-JIM KIM et al., 2012) quanto *in vivo* (SEHGAL et al., 2011).

HIPÓTESE E OBJETIVOS

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Para a proposta do presente projeto de pesquisa foi levantada a seguinte hipótese:

"SSCs que apresentam maior expressão de alfa-6 integrina são mais eficientes para modificações genéticas e colonização de túbulos seminíferos."

Para chegarmos a essa afirmação, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Dissociar células testiculares murinas de filhotes e realizar o plaqueamento diferencial para enriquecer a fração de SSCs;

2. Avaliar a viabilidade das células testiculares após criopreservação;

3. Separar células espermatogoniais que apresentam marcação para alfa-6 integrina por citometria de fluxo;

4. Transformar células espermatogoniais cultivadas *in vitro* com o gene marcador LacZ;

5. Transplantar células espermatogoniais contendo o gene LacZ para testículos de camundongos adultos.

CAPITULO 1: Dissociação e criopreservação de células germinativas testiculares de filhotes murinos

CAPÍTULO 1: Dissociação e criopreservação de células germinativas testiculares de filhotes murinos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção, cultivo *in vitro*, congelamento e verificação da viabilidade pós-descongelamento das células testiculares foram utilizados filhotes de camundongos da linhagem C57BL/6 com 8-11 dias de idade (n=118). Todos os animais foram provenientes do Biotério dos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal e sua utilização na pesquisa foi aprovada pela Comissão de Bioética para o Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 DISSOCIAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES DE FILHOTES MURINOS

Para isolar as células germinativas testiculares, testículos de camundongos com idade variando de 8 a 11 dias foram submetidos de forma conjunta a uma dupla digestão enzimática, conforme protocolo descrito por van Pelt et al. (1996), com algumas modificações. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. A região abdominal foi desinfetada com álcool 70% (v/v) e incisada com tesoura cirúrgica. Com o auxílio de pinças finas os testículos foram removidos cuidadosamente, evitando a ruptura de sua cápsula, e colocados em uma placa de Petri de 60 mm (TPP, Suíça) contendo PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (PBS), aquecido a 37ºC. Nesta placa, partes de tecidos adjacentes ao testículo foram removidas. Em seguida, os testículos foram lavados em PBS e transferidos para um tubo de microcentífuga para pesagem.

Imediatamente antes da digestão enzimática os testículos foram fragmentados no próprio tubo de microcentrífuga com auxílio de uma tesoura cirúrgica. Aos fragmentos foi adicionado 10 mL de DMEM digestão (Anexo A), contendo colagenase, hialuronidase e tripsina, para cada grama de tecido e a suspensão transferida para um tubo cônico de centrífuga de 15 mL. Os fragmentos foram incubados durante 15 minutos em banho-maria a 37ºC, sendo homogeneizados vagarosamente com uma pipeta de Pasteur a cada 5 minutos. Ao tecido parcialmente digerido foi adicionado 10% (v/v) de soro fetal bovino (FCS – do inglês *fetal calf serum*, Gibco, Brasil) e centrifugado a 400 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e ao sedimento foi adicionado DMEM digestão (10 mL para cada grama de tecido) e incubado novamente em banho-maria a 37ºC, durante 30 minutos, sendo homogeneizado vagarosamente com uma pipeta de Pasteur a cada 10 minutos. Após a segunda digestão enzimática foi adicionado novamente 10% (v/v) de FCS e as células centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e ao sedimento foi adicionado 10 mL de DMEM cultivo (Anexo B). A concentração e viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com azul de tripan (5 mg/mL, em PBS), utilizando câmara de Neubauer.

4.2 PLAQUEAMENTO DIFERENCIAL

Após a determinação da concentração de células viáveis, estas foram divididas em placas de Petri de 60 mm, mantendo-se uma concentração de aproximadamente 5 x 10^6 células viáveis por placa, em 3 mL de DMEM cultivo. As células foram cultivadas em incubadora com 5% (v/v) de CO_2 em ar, temperatura de 37ºC e umidade saturada, permanecendo por 16 a 17 horas. Após esse tempo, em teoria, a maioria das células somáticas do estroma testicular adere-se ao fundo da placa enquanto a maioria das células da linhagem germinativa permanece em suspensão. A esse fato denominamos de plaqueamento diferencial.

As células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrífuga de 50 mL e homogeneizadas para determinação da concentração e viabilidade pelo

método de exclusão com azul de tripan. Dessa suspensão, aproximadamente 2 x 10^6 células viáveis, em 3 ml de DMEM cultivo, foram transferidas para uma placa de Petri de 60 mm e cultivadas nas mesmas condições do plaqueamento diferencial, por aproximadamente 48 horas. O restante das células em suspensão foi então submetido ao protocolo de congelação.

4.3 CONGELAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES

O meio de congelação, DMEM congelação (Anexo C), foi preparado previamente ao plaqueamento diferencial, pois necessita equilibrar-se à temperatura de -20°C para estar pronto para o uso.

As células em suspensão foram divididas em dois tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o DMEM congelação adicionado para a ressuspender as células. A quantidade de meio de congelação adicionada foi a necessária para obter-se uma concentração de $2x10^6$ células/mL. Após ressupender, rapidamente foi transferido 1 mL da suspensão para criotubos de 1,8 mL. Os criotubos foram acondicionados em container de congelação de policarbonato (Mr. Frosty, Nalgene Labware®) e lavados a um freezer -80°C por um período de aproximadamente 24 horas. Após esse tempo, os criotubos foram transferidos para container de nitrogênio líquido (-196°C).

4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-CULTIVO *IN VITRO*

As células que permaneceram em cultivo *in vitro* foram avaliadas após 48 horas quanto à sua viabilidade. Para isso, o meio com as células em suspensão foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e uma amostra retirada para coloração pelo método de exclusão com azul de tripan.

4.5 DESCONGELAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAÇÃO

Após armazenagem em nitrogênio líquido, os criotubos foram rapidamente transferidos para um banho-maria a 37°C e descongelados durante 30 segundos. O meio DMEM cultivo aquecido a 37°C foi adicionado ao criotubo e pipetou-se para completar o descongelamento. Em seguida, o meio com as células em suspensão foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e centrifugado a 400 x g durante 5 minutos. Concluída a centrifugação, as células foram ressuspendidas em DMEM cultivo e a viabilidade pós-descongelamento avaliada pelo método de exclusão por azul de tripan.

5 RESULTADOS

5.1 DISSOCIAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES DE FILHOTES MURINOS

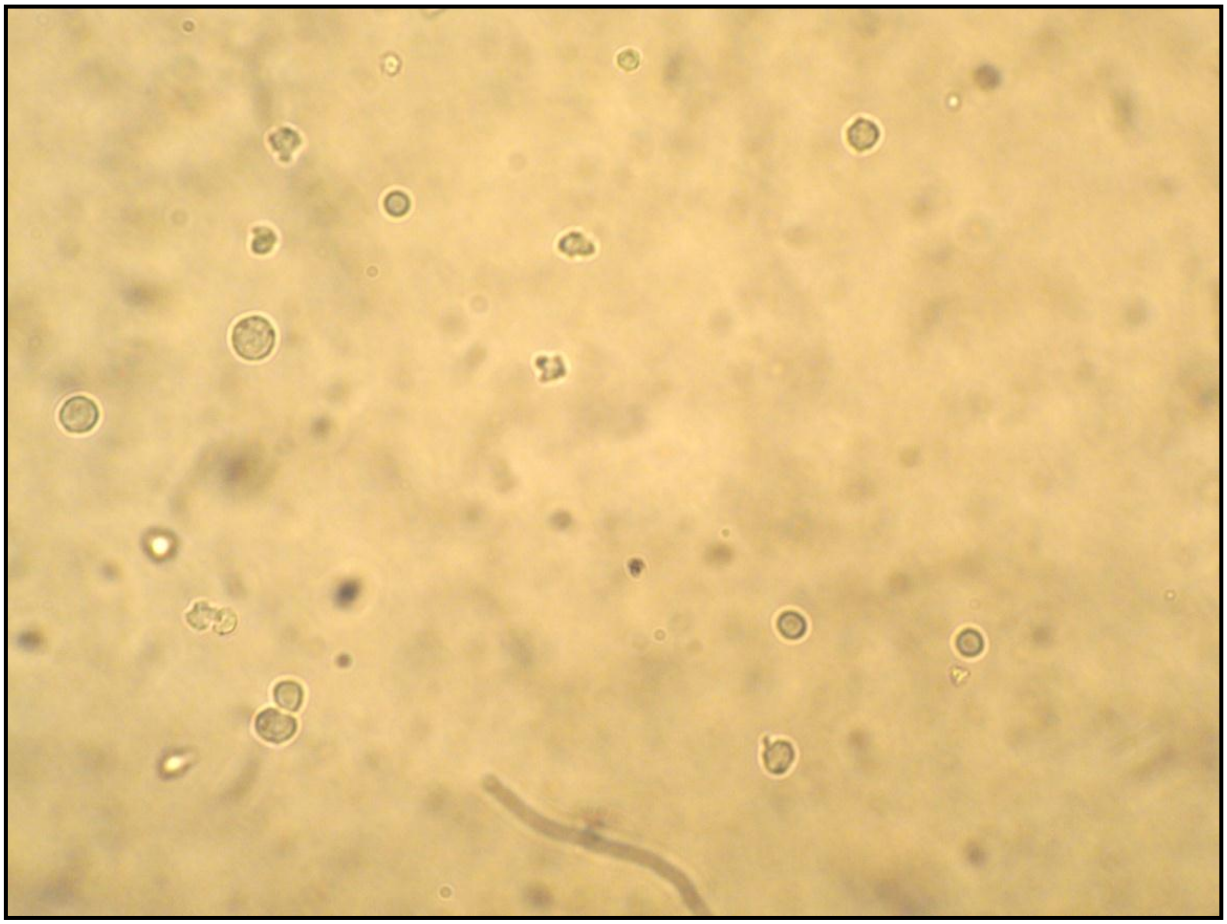
Ao total, foram realizadas seis manipulações de dissociação de células germinativas testiculares de filhotes de camundongos (Quadro 1). O número médio de células testiculares viáveis obtidos após a digestão enzimática foi de $3,55 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^6$ e a viabilidade média foi de 79% ± 1,1%. Todos os resultados são expressos com o número médio ± SEM (do inglês *standard error of the mean* – erro padrão da média), tendo como "n"=6.

Quadro 1 – Resumo das manipulações realizadas para isolamento de células testiculares murinas

Manipulação	Data	Nº de animais (idade em dias)	Massa testicular total (g)	Células viáveis	Viabilidade (%)
1	08/05/2012	20 (10, 9 e 8)	0,1856	2,48E+07	79,0
2	22/05/2012	20 (10, 9 e 8)	0,1853	4,04E+07	82,0
3	09/06/2012	20 (10, 9 e 8)	0,1902	2,84E+07	82,0
4	23/06/2012	18 (11, 10, 9 e 8)	0,2240	3,48E+07	75,0
5	29/07/2012	20 (11, 10 e 9)	0,2038	4,64E+07	78,0
6	30/08/2012	20 (10, 9 e 8)	0,1774	3,80E+07	78,0

Após a digestão enzimática observou-se uma população de células de tamanhos variados, que consistia tanto de células populações da linhagem germinativa quanto de células do parênquima testicular (Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografia representativa de células testiculares de filhotes de camundongos após digestão enzimática obtida por microscopia invertida de contraste diferencial de fase (magnificação de 400 x)



Fonte: (WORST, R. A.; 2012).

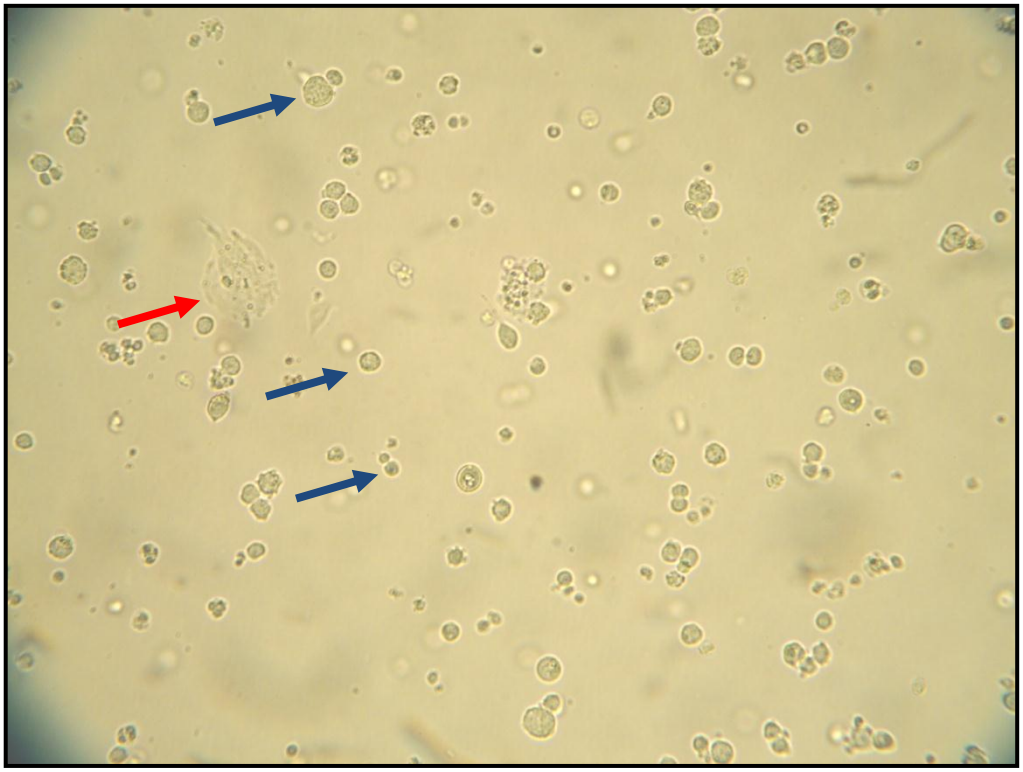
5.2 PLAQUEAMENTO DIFERENCIAL

O cultivo por um período de 16 a 17 horas promoveu a aderência de poucas células do parênquima testicular, resultando em uma grande quantidade de células no sobrenadante (Figura 4). O número médio de células viáveis que permaneceram no sobrenadante foi de $1,85 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^6$ e a viabilidade média foi de 68% $\pm$ 3,92% (Quadro 2).

Quadro 2 – Resultados obtidos após o plaqueamento diferencial

Manipulação	Data	Células viáveis	Viabilidade (%)
1	08/05/2012	1,17E+07	77,0
2	22/05/2012	2,31E+07	67,5
3	09/06/2012	1,60E+07	73,0
4	23/06/2012	1,75E+07	71,0
5	29/07/2012	2,15E+07	70,0
6	30/08/2012	2,13E+07	49,5

Figura 4 – Fotomicrografia representativa de células testiculares de filhotes de camundongos após plaqueamento diferencial, obtida por microscopia invertida de contraste diferencial de fase (magnificação de 200 x). Células da linhagem germinativa de diversos tamanhos (setas azuis) e célula aderida do parênquima testicular (seta vermelha)



Fonte: (WORST, R. A.; 2012).

5.3 DESCONGELAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAÇÃO

A quantidade de criotubos congelados variou conforme o número de células obtidas após o plaqueamento diferencial (2 x 10^6 células por criotubo). Os criotubos resultantes da congelação de cada manipulação ficaram armazenados em nitrogênio líquido até a descongelação, que ocorreu em diferentes datas. A viabilidade média das células após o descongelação foi de 42,5% ± 2,36% (Quadro 3).

Quadro 3 – Porcentagem de células viáveis obtida após a descongelação

Manipulação	Data	Número de criotubos	Viabilidade (%)
1	08/05/2012	4	49,0
2	22/05/2012	10	44,0
3	09/06/2012	6	48,0
4	23/06/2012	7	39,5
5	29/07/2012	9	41,0
6	30/08/2012	9	33,5

5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PÓS-CULTIVO *IN VITRO*

As células que permaneceram por 48 horas em cultivo *in vitro* após o plaqueamento diferencial foram avaliadas quanto à viabilidade. A viabilidade média das células foi de 53,75% ± 3,45% (Quadro 4).

Quadro 4 – Viabilidade obtida após 48 horas de cultivo *in vitro*

Manipulação	Data	Viabilidade (%)
1	08/05/2012	64,0
2	22/05/2012	47,5
3	09/06/2012	47,0
4	23/06/2012	51,0
5	29/07/2012	65,0
6	30/08/2012	48,0

6 DISCUSSÃO

O objetivo proposto para a primeira fase deste projeto foi de isolar células espermatogoniais de filhotes murinos e criopreservá-las, sendo avaliados parâmetros como número de células isoladas e a viabilidade celular após cada etapa.

A linha de pesquisa relacionada ao isolamento e cultivo de células-tronco espermatogoniais de murinos é recente na rotina do laboratório e, apesar de uma vasta literatura, essas etapas devem ser padronizadas segundo às condições de cada laboratório. Para diminuir a variabilidade entre as manipulações, optou-se pela escolha de uma linhagem de camundongos isogênicos (C57Bl6), utilizando animais de idade próximas e adotou-se sempre o mesmo protocolo para todas as etapas. Apesar de todos os cuidados tomados, sempre foi observada uma variação entre as manipulações.

Segundo Tegelenbosch e de Rooij (1993), o testículo de camundongos possui aproximadamente 35.000 espermatogônias do tipo A_S. Por esse motivo, um protocolo de digestão que proporcione uma boa recuperação e uma boa viabilidade é fundamental. A viabilidade celular média observada após a digestão foi de 79% $\pm$ 1,10%. Este valor ficou muito aquém em relação à média obtida por Brinster e Avarbock (1994), que foi geralmente maior que 95% pelo método de exclusão com azul de tripan, utilizando um protocolo semelhante para a digestão. Esse fato pode ter comprometido as etapas seguintes do projeto, o que não foi comprovado pois não houve uma caracterização das populações de células dissociadas. Embora a população de células viáveis recuperadas ser composta de células germinativas e parenquimais, o total de $3{,}55 \times 10^7 \pm 3{,}2 \times 10^6$ poderia conter uma população de células germinativas satisfatória. Frente a esses resultados, é necessário uma adequação do protocolo de digestão, como por exemplo, diminuição do tempo de exposição das células à ação enzimática, o que poderia melhorar o porcentual de células viáveis mas poderia compromoter o total de células obtidas.

Como descrito por Izadyar et al. (2002), após o plaqueamento diferencial a maioria das células somáticas, entre elas células mioepiteliais e de Sertoli, aderem-se ao fundo da placa e as células da linhagem germinativa permanecem em

suspensão. Duas populações distintas de células foram observadas em microscopia óptica após o plaqueamento diferencial. No entanto, poucas células foram observadas aderidas ao fundo da placa. Esse fato demonstra que o plaqueamento diferencial não foi eficaz para a purificação da população de células espermatogoniais murinas. Duas possibilidades podem ser sugeridas para essa técnica de purificação não ter obtido êxito. A primeira é que, durante o processo de digestão muitas células somáticas podem ter morrido e, consequentemente, a quantidade destas aderidas ao fundo da placa seria reduzido, processo que pode ter ocorrido também com as células germinativas. A segunda possibilidade pode estar relacionada a fonte proteica utilizada, albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*). Este pode não ter oferecido todos os substratos necessários para que as células somáticas pudessem se recuperar do processo de digestão e se aderir ao fundo da placa, dando continuidade as suas funções celulares. Esse fato também pode ter influência nos resultados obtidos para a criopreservação, pois tratando-se de células diferentes, o protocolo de congelamento poderia ter sido melhor para as células somáticas em detrimento das espermatogoniais.

A capacidade funcional de células espermatogoniais criopreservadas de animais doadores em gerar uma espermatogênese desejável e subsequente fertilidade em um testículo de animais receptores já foi comprovada (AVARBOCK; BRINSTER; BRINSTER, 1996; XIANG WANG et al., 2008). Os resultados descritos na literatura científica, utilizando protocolos de congelação e descongelação e em condições semelhantes às utilizadas nesse projeto ainda estão abaixo do desejável. Em dois estudos, Frederickx et al. (2004) e Alipoor et al. (2009) testaram diversos protocolos de criopreservação em condições semelhantes de congelação (50% de FCS) e obtiveram uma viabilidade média de 36% e de 39,6%, respectivamente. O protocolo de congelação executado no presente estudo apresentou resultado semelhante, pois foi obtida uma viabilidade média após a descongelação de 42,5% $\pm$ 2,36%. Essa viabilidade ainda poderia ter sido maior se as condições de cultivo *in vitro* fossem melhores ou até mesmo se a concentração de FCS utilizada fosse maior, como demonstrado no estudo de Alipoor et al. (2009).

Usualmente, os protocolos utilizados para manter células-tronco espermatogoniais por longos períodos de cultivo *in vitro* fazem uso de co-cultivo destas células com células de sustentação, como células STO (NAGANO et al., 1998), de associações de fatores de crescimento (KANATSU-SHINOHARA et al.,

2003) ou até mesmo de ambos (KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2004b). Para o presente estudo, não estava previsto o cultivo *in vitro* de células espermatogoniais por longos períodos. No entanto, após o plaqueamento diferencial de cada manipulação, uma parte das células em suspensão foi mantida em cultivo *in vitro* por um período de mais 48 horas, sem o uso de qualquer célula de suporte ou de fatores de crescimento. A viabilidade celular média após esse período foi de 53,75% ± 3,45%. Durante esse período, além de um número de células viáveis baixo, não se notou um aumento no número total de células (dados não apresentados). Esse fato demonstra que as células em cultivo além de não estarem se multiplicando estavam morrendo. Um estudo da expressão de marcadores não foi realizado, portanto, não é possível afirmar se as células sobreviventes eram de fato células-tronco espermatogoniais.

Como conclusões referentes a esta primeira fase pode-se afirmar que foi possível realizar a dissociação de células germinativas testiculares murinas e cultivá-las *in vitro*, mas são necessárias adequações do protocolo de digestão para incrementar a viabilidade das células. Esse fato pode ter comprometido o plaqueamento diferencial, o qual não apresentou o resultado esperado. E finalmente, o protocolo de congelação mostrou resultado semelhante ao descrito pela literatura.

CAPÍTULO 2: Separação celular ativada por fluorescência de células germinativas testiculares de filhotes murinos

CAPÍTULO 2: Separação celular ativada por fluorescência de células germinativas testiculares de filhotes murinos

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 INCUBAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES COM ANTICORPO ANTI-ALFA-6 INTEGRINA

As células germinativas testiculares que estavam criopreservadas foram descongeladas conforme descrito no item 4.5. As células foram centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos. O sobrenadante resultante foi removido e adicionou-se PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} acrescido de 1% (m/v) de BSA. A quantidade de PBS+BSA acrescentada correspondia a 995 µL para cada 10^6 células. À suspensão de células foi acrescentado 5 µL do anticorpo anti-alfa-6 integrina (Alexa Fluor® 488 anti-human/mouse CD49f antibody, Biolegend, San Diego, CA, EUA), correspondendo a uma titulação de 1:200. As células foram então levadas à incubadora com 5% (v/v) de CO_2 em ar, temperatura de 37ºC e umidade saturada, por 30 minutos. Como controle negativo, foi preparado um tubo contendo 1 x 10^6 células viáveis incubadas apenas com 995 µL de PBS+BSA. Transcorrido esse tempo, as células foram centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos. Após, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e as células foram ressuspendidas em 2 mL de PBS e centrifugadas novamente. Essa etapa foi realizada por duas vezes. Ao término da segunda centrifugação, as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS+BSA e filtradas utilizando uma malha de 0,70 micrômetros em um tubo de poliestireno de 5 mL. Após, os tubos contendo as células filtradas foram acondicionados em uma caixa isotérmica, protegidas da luz, e encaminhadas para a separação celular ativada por fluorescência.

7.2 SEPARAÇÃO CELULAR ATIVADA POR FLUORESCÊNCIA (FACS)

A separação celular ativada por fluorescência (FACS) ou “sorting” foi realizada no Instituto de Química no laboratório da Dra. Mari Sogayar. O aparelho utilizado foi o BD FACSAria^{TM}-II Sorter (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA). Três gráficos distintos foram gerados. O primeiro gráfico com o eixo “y” correspondendo à complexidade das células (*side scatter-SSC-A*) e o eixo “x” ao tamanho das células (*forward scatter-FSC-A*). Neste gráfico, os pontos com alta complexidade e tamanho foram consideradas células duplas (doblets) e os pontos com baixa complexidade e tamanho foram considerados células degeneradas ou detritos. Sendo assim, assumiram-se como células germinativas testiculares aquelas que formavam uma população homogenia de média complexidade e tamanho. O segundo gráfico com o eixo “y” correspondendo ao número total de células (*count*) e o eixo “x” à intensidade de marcação com alfa-6 integrina (*FITC-A*), correspondente a fluorescência com o mesmo comprimento da onda do Alexa Fluor 488. O terceiro gráfico com o eixo “y” correspondendo à complexidade das células (*side scatter-SSC-A*) e o eixo “x” à intensidade de marcação com alfa-6 integrina (*FITC-A*). No primeiro gráfico foi selecionada dentre todos os eventos a população de células correspondente às células espermatogoniais, denominado P1. No segundo gráfico foi delimitado o ponto a partir do qual seriam selecionadas somente as células com marcação para alfa-6 integrina, denominado P2. No último gráfico delimitaram-se duas populações de células, as que apresentavam marcação para alfa-6 integrina, denominado P3, e as que não apresentavam marcação, denominado P4. Para o “sorting” as células espermatogoniais foram separadas em três grupos: um grupo de células que não foram incubadas com o anticorpo anti-alfa-6 integrina e que se constituíam tanto das células presentes em P3 quanto em P4 (NÃO INC); um grupo de células presentes somente em P3 (ALFA-6 +); e um grupo de células presentes somente em P4 (ALFA-6 -). Para análise foram avaliados 10.000 eventos referentes a todas as detecções. A porcentagem de células que correspondentes ao P3 e P4 foram calculadas, sendo o valor de 100% para todos os eventos.

Enquanto as células eram separadas ficavam em um tubo de centrífuga de 15 mL contendo PBS+BSA. Terminado o “sorting” os tubos foram acondicionados em uma caixa isotérmica, protegidas da luz, e encaminhadas para o laboratório. No laboratório, as células separadas foram avaliadas quanto à concentração e viabilidade pelo método de exclusão pelo azul de tripan.

7.3 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES ITGα6, GFRα1, OCT-4 E THY-1 EM CÉLULAS ESPERMATOGONIAIS APÓS FACS

A verificação da expressão de marcadores de células-tronco espermatogoniais foi realizada para os genes ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1. No total aproximadamente 20.000 células viáveis foram processadas para avaliação por RT-PCR quantitativo. Para isso, as células foram transferidas para um criotubo de 1,8 mL e centrifugadas 2000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspendido em PBS. Uma nova centrifugação como a anterior foi efetuada. O sobrenadante foi removido, procurando-se retirar o máximo possível de PBS. Ao final, o criotubo foi transferido diretamente ao nitrogênio líquido (-196ºC).

O RNA total das amostras congeladas foi extraído com *RNeasy Protect Mini Kit* (Qiagen, Valencia, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi eluído da coluna com volume de 50 µL de *RNase-free water*. A concentração de RNA total foi verificada por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies Inc.,Wilmington, Delaware, EUA). O RNA extraído foi utilizado para a síntese do cDNA com *Superscript® VILO™ cDNA synthesis kit* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Como a quantidade de RNA obtido foi muito menor do que a necessária para a reação de síntese de cDNA, o mesmo volume de RNA de cada amostra foi utilizado para essa reação, sendo este de 14 µL. A concentração de cDNA total também foi verificada por espectrofotometria. A mesma quantidade de cDNA foi usada em cada reação de PCR quantitativo.

As análises de RT-PCR quantitativo foram realizadas no sistema de detecção Realplex Mastercycler (Eppendorf®), utilizando o *SYBR GreenER™ qPCR Supermix Universal* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), com 10 µL de volume por reação. Como controles endógenos foram utilizados os genes gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e beta actina (ACTB). Os *primers* foram desenhados com auxílio do *software* Primer3 (Quadro 5) e Netprimer. Para todas as amplificações, foi utilizado um programa de 3 passos: 95°C/ 15 s, 58°C/ 15 s e 68°C/ 20 s por 40 ciclos, seguido da curva de dissociação. Como controle negativo da reação utilizou-se a mesma reação sem a adição da amostra de cDNA.

A análise estatística dos dados foi feita pelo método Pfaffl (Michael W. Pfaffl, Technical University Munich) utilizando o software REST 2009 (QIAGEN) no qual eficiências de amplificação dos *primers* determinadas experimentalmente são utilizadas para verificar a expressão dos genes alvos (ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1) em relação aos genes endógenos (GAPDH e ACTB). Na análise estatística foi comparada a expressão gênica dos grupos “NÃO INC” e “ALFA-6 +”.

Quadro 5 – Sequências de oligonucleotídeos utilizadas dos genes alvo ITGα6, GFRα1, Oct-4, Thy-1 e dos genes constitutivos (controle endógeno) ACTB e GAPDH

Genes	**Primers**	**Concentração (nM)**
ACTB	F: 5´ GTCCACCTTCCAGCAGATGT 3´	200
	R: 5´ GTCACCTTCACCGTTCCAGT 3´	400
GAPDH	F: 5´ AACTTTGGCATTGTGGAAGG 3´	200
	R: 5´ ACACATTGGGGGTAGGAACA 3´	200
ITGα6	F: 5´ GGACACCCGCGAGGACAACG 3´	200
	R: 5´ TGCCCCCACAAGCAACAGCC 3´	200
GFRα1	F: 5´ GTGGACAGGCAGGATGAAAT 3´	200
	R: 5´ CTGGCAGGACTCAACTGTGA 3´	200
Oct-4	F: 5´ GACCGCCCCAATGCCGTGAA 3´	400
	R: 5´ GGGCTTTCATGTCCTGGGACTCCT 3´	400
Thy-1	F: 5´ CCAATGAGGATGAGGGCTTA 3´	800
	R: 5´ GCAGGCTCGTGTTTTAGAGG 3´	800

8 RESULTADOS

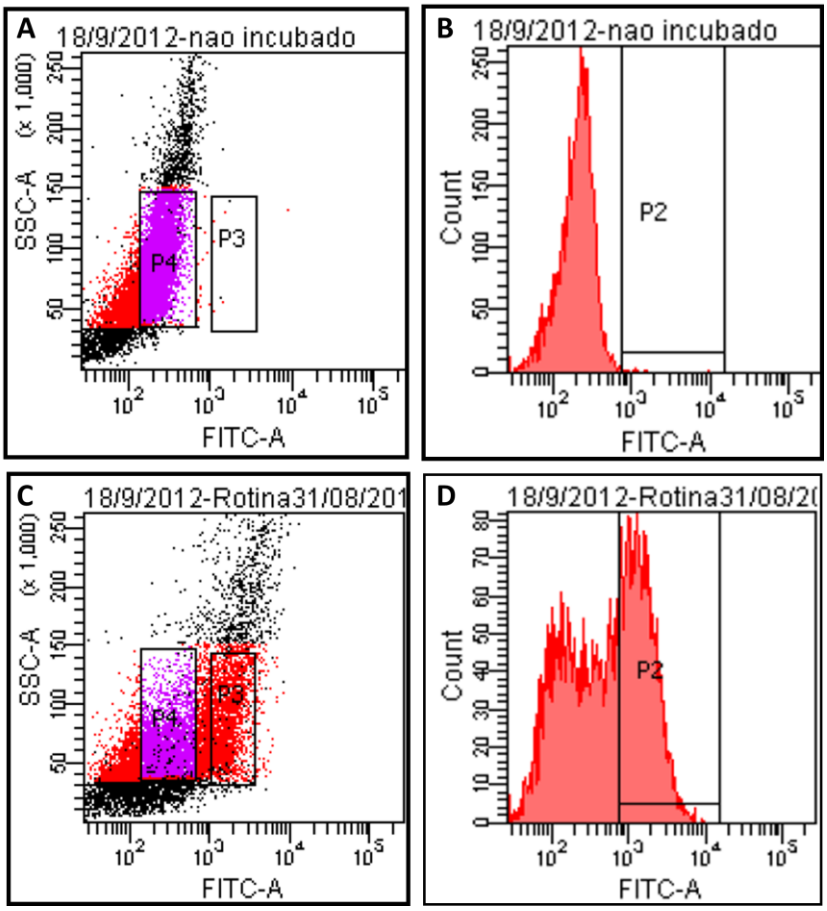
8.1 SEPARAÇÃO CELULAR ATIVADA POR FLUORESCÊNCIA

Uma rotina de citometria de fluxo para análise da concentração do anticorpo a ser utilizada foi realizada utilizando células da manipulação 1 (08/05/2012). Ao total foram realizadas três rotinas de FACS utilizando células das seguintes manipulações: “sorting 1” (manipulação 2 – 22/05/2012); “sorting 2” (manipulações 3 e 4 – 09/06/2012 e 23/06/2012, respectivamente); e “sorting 3” (manipulações 5 e 6 – 29/07/2012 e 30/08/2012, respectivamente). O gráfico que representa as populações de células que expressavam ou não alfa-6 integrina está demonstrado na figura 5. Os valores referentes à porcentagem total da população de células que expressaram e a população de células que não expressaram alfa-6 integrina estão demonstrados no quadro 6.

Quadro 6 – Porcentagem total da população de células positivas e negativas para expressão de alfa-6 integrina em diferentes rotinas de FACS (considerando 10.000 eventos)

“Sorting” (data)	**Manipulações (datas)**	**Expressa alfa-6 integrina (%)**	**Não expressa alfa-6 integrina (%)**
1 (27/07/2012)	2 (22/05/2012)	7,4	52,8
2 (11/09/2012)	3 e 4 (09/06/2012 e 23/06/2012)	17,0	3,3
3 (18/09/2012)	5 e 6 (29/07/2012 e 30/08/2012)	17,8	18,3

Figura 5 – Expressão de alfa-6 integrina em células germinativas testiculares murinas avaliadas por FACS. Eixo "y": complexidade celular (*side scatter-SSC-A*). Eixo "x": intensidade de marcação com alfa-6 integrina (*FITC-A*). Em (A) controle negativo para a reação e em (C) amostra incubada com anticorpo anti-alfa-6 integrina. Em (B) e (D) histograma representando o controle negativo e a amostra incubada com anticorpo, respectivamente. P4 representa a população de células negativas e P3 representa a população de células positivas para alfa-6 integrina, que também corresponde ao P2



Fonte: (WORST, R. A.; 2012).

8.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES ITGα6, GFRα1, OCT-4 E THY-1 EM CÉLULAS GERMINATIVAS TESTICULARES APÓS FACS

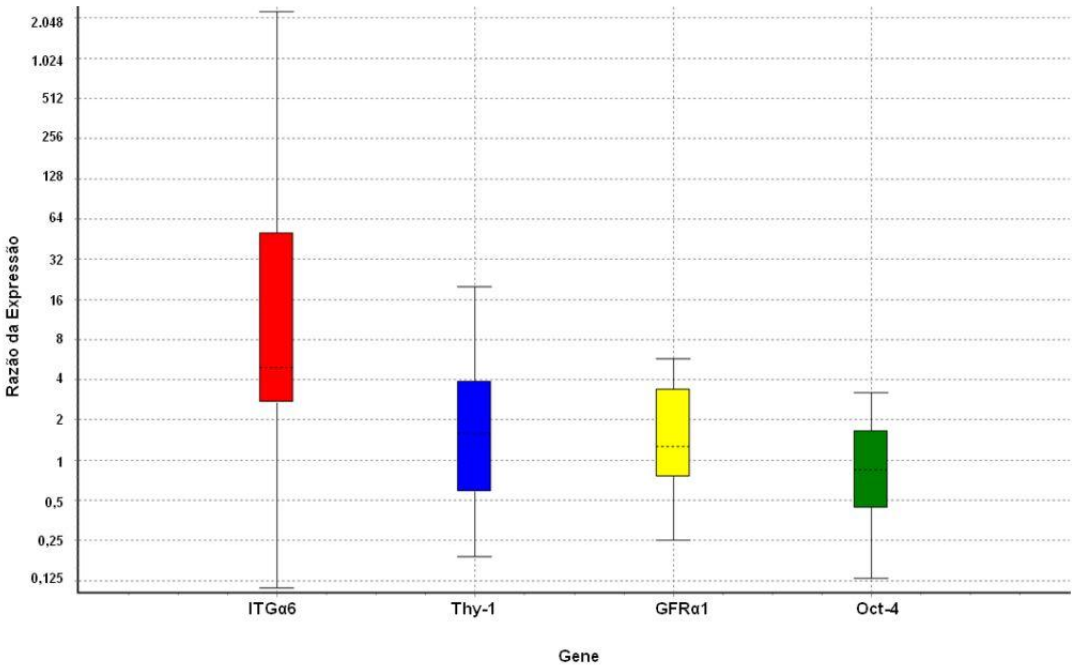
Para verificar a eficiência do "sorting" na purificação das células espermatogoniais foram comparadas as expressões dos genes ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1 dos grupos "ALFA-6 +" e "NÃO INC" após a separação celular ativada por fluorescência. Foi detectada a expressão dos genes estudados em todas as

amostras. Não foi observada diferença na expressão dos quatro marcadores (ITGα6: p=0,461, GFRα1: p=0,655, Oct-4: p=0,887 e Thy-1: p=0,597; Tabela 1) entre o grupo "ALFA-6 +" e o grupo "NÃO INC". Não foi detectada nenhuma expressão dos quatro marcadores na amostra do grupo "ALFA-6 -" do "sorting 2". Possivelmente esta foi comprometida pelo contato com o nitrogênio líquido durante a armazenagem e, portanto, esse grupo não pôde entrar para a análise estatística. A figura 6 ilustra o perfil de expressão destes quatro marcadores.

Tabela 1 – Expressão relativa de ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1 em células germinativas testiculares murinas após separação celular ativada por fluorescência - FACS - São Paulo - 2012

Gene	Tipo	Expressão ALFA-6 +/NÃO INC	95% Intervalo de Confiança	p
GAPDH	Controle Endógeno	0,762		
ACTB	Controle Endógeno	1,311		
ITGα6	Alvo	9,686	0,119 - 2.066,240	0,461
GFRα1	Alvo	1,481	0,351 - 5,341	0,655
Thy-1	Alvo	1,821	0,257 - 18,156	0,597
Oct-4	Alvo	0,821	0,182 - 3,085	0,887

Figura 6 – Expressão relativa dos genes ITGα6, Thy-1, GFRα1 e Oct-4 em células germinativas testiculares de filhotes de camundongos avaliada por RT-PCR quantitativo



Fonte: (WORST, R. A.; 2012).

9 DISCUSSÃO

Na segunda etapa deste projeto o objetivo proposto inicialmente previa a separação celular ativada por fluorescência das células espermatogoniais com alta expressão de alfa-6 integrina e células espermatogoniais com baixa expressão de alfa-6 integrina. No entanto, após uma primeira análise constatou-se que o número de células obtidas após o “sorting” para ambas as populações seria insuficiente para dar continuidade ao projeto, que previa a transformação e transplante dessas células. Sendo assim, dois grupos de células foram formados: células que expressavam e células que não expressavam alfa-6 integrina, e uma análise de expressão gênica de alguns marcadores de SSCs foi realizada. A seleção de células espermatogoniais por FACS ou MACS por meio de marcadores de superfície (ITGα6, GRFα1 e Thy) levam a uma colonização mais eficiente de testículos depletados de espermatogônias (SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER, 1999; BUAGEAW et al., 2005; KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2004b). Além disso, a expressão de fatores de transcrição como Oct-4 são expressos em populações purificadas pelos marcadores supracitados (OHBO et al., 2003). Desta maneira a hipótese “SSCs que apresentam maior expressão de alfa-6 integrina são mais eficientes para modificações genéticas e colonização de túbulos seminíferos” poderia ser defendida parcialmente.

Shinohara, Avarbock e Brinster (1999) relataram pela primeira vez que a seleção de células espermatogoniais que expressavam alfa-6 integrina e beta-1 integrina produziam populações de células com uma maior habilidade de colonizar túbulos seminíferos de animais receptores. No presente estudo foi realizada a seleção de células positivas apenas para a alfa-6 integrina por separação FACS, diferentemente do trabalho realizado por Shinohara, Avarbock e Brinster (1999), no qual foram utilizadas “beads” magnéticas (MACS, do inglês *magnetic-activated cell sorting*).

Devido às perdas que poderiam ocorrer durante o isolamento, cultivo *in vitro*, congelação e pelo próprio “sorting” era esperado ao final um número reduzido de células para o transplante. Prevendo essas perdas, 118 testículos de camundongos foram utilizados nesse projeto, pois como citado no capítulo anterior, o número de

espermatogônias do tipo A_s no testículo de camundongos é de aproximadamente 35.000 (TEGELENBOSCH; DE ROOIJ, 1993). No entanto, a viabilidade em diversas etapas até a realização da FACS ficou aquém do que esperávamos e a quantidade de células obtidas foi utilizada somente para estudar o perfil de expressão gênica.

Os marcadores gênicos utilizados nesse estudo (GFRα1, ITGα6, OCT4 e Thy1) são bem descritos na literatura científica por serem expressos em células-tronco, bem como em células espermatogoniais (SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER, 1999; PESCE; SCHÖLER, 2000; KUBOTA et al., 2003; BUAGEAW et al., 2005). O estudo de expressão gênica no grupo “ALFA-6 +” e no grupo “NÃO INC” não apresentou diferença estatística entre os genes estudados (Tabela 1). Embora tenha se observado uma maior expressão do gene ITGα6 no grupo “ALFA-6 +” (dados não apresentados) a análise estatística não comprovou essa diferença.

Portanto, pode-se sugerir que os dois grupos avaliados eram compostos de células espermatogoniais em diferentes estágios de desenvolvimento, pois a transcrição dos genes marcadores foi detectada em ambos. Nakagawa et al. (2010) constataram várias evidências que sugerem uma maior plasticidade de células espermatogoniais, ou seja, que células já comprometidas com a diferenciação podem mudar seu padrão de expressão gênica e retornar até um estágio anterior de seu desenvolvimento ou até mesmo ao estágio de espermatogônia A_s. Esse fato colabora com a hipótese de que mesmo as células do grupo que não foi selecionado pela expressão da alfa-6 integrina também poderiam expressar outros marcadores de células espermatogoniais.

Concluindo, podemos afirmar que marcador molecular alfa-6 integrina serve de referência para separar populações de células testiculares por FACS, pois foi detectada a expressão gênica avaliada por RT-PCR quantitativo de ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1 em células germinativas testiculares de filhotes murinos. No entanto, não houve diferença estatística de genes marcadores de células-tronco espermatogoniais entre as populações de células com e sem marcação para alfa-6 integrina.

CAPÍTULO 3: Padronização das técnicas de transformação e transplante de células testiculares de filhotes murinos

CAPÍTULO 3: Padronização das técnicas de transformação e transplante de células testiculares de filhotes murinos

Como mencionado no capítulo anterior, o projeto inicial previa que após o "sorting" das células espermatogoniais estas seriam transformadas com o vetor lentiviral e após, transplantadas para testículos de camundongos adultos. Como o número de células viáveis obtidas após a FACS foi insuficiente não foi possível a realização das últimas etapas. No entanto, para a padronização da transformação e do transplante foram realizados testes. Devido a limitações de animais, de células espermatogoniais e dos vetores lentivirais o número de repetições para estes testes foi insuficiente para a realização de uma análise estatística.

10 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a transformação das células espermatogoniais foi utilizado o vetor LV-LacZ (Addgene). Este é um vetor lentiviral que contém a sequência bacteriana LacZ que codifica a proteína beta-galactosidase. A beta-galactosidase cliva o corante X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside) resultando em um produto insolúvel azul. Assim, células transduzidas com este vetor, submetidas à reação com X-gal, tornam-se azuis. A produção do vetor lentiviral foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Bryan E. Strauss (Setor de Vetores Virais, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração, Incor, FM-USP).

Uma análise foi efetuada para verificar se a transformação ocorria nas células testiculares murinas. Para isso, células testiculares criopreservadas foram descongeladas, como descrito no item 4.1.5, e 10^5 células foram incubadas com $7{,}5 \times 10^5$ partículas virais, MOI (*multiplicity of infection* – multiplicidade de infecção) de 7,5 em 100 µL de DMEM cultivo contendo 4 µg/mL de polibreno (Hexadimethrin Bromid, Sigma, Cat: 10.768-9), por 3 horas a 37ºC, alta umidade e 5% de CO_2. Após as células foram cultivas em DMEM cultivo em uma placa de Petri de 35 mm sob as mesmas condições por 24 horas. Após esse período, as células foram submetidas a

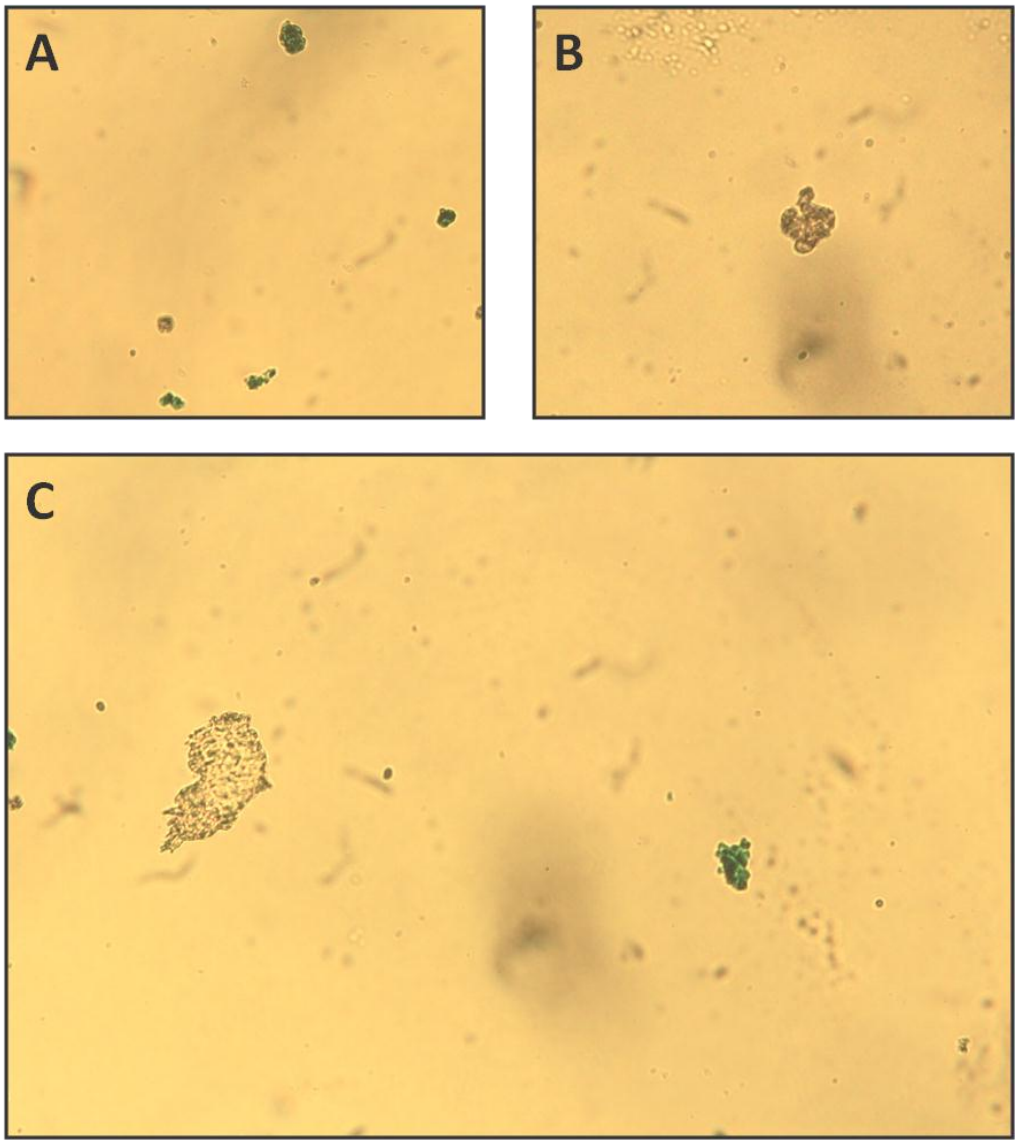
três lavagens em PBS e fixadas em solução de glutaraldeído 0,2% (v/v), paraformaldeído 2% (m/v) e 0,1M fosfato de sódio monobásico (pH=7,3) a 4ºC por 5 min. Após duas lavagens em PBS, as células foram incubadas com o corante X-gal (Anexo D) por 16 h a 37ºC. Para a avaliação, as células foram fixadas entre lâmina e lamínula e examinadas em microscópio óptico de campo claro (Olympus®) para a visualização das células positivas (coradas em azul) para expressão do gene LacZ.

Na padronização da técnica de transplante de células espermatogoniais foram efetuados testes em camundongos da linhagem C57Bl6, com idade entre 4 e 6 meses. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Sigma, Cat: T-48402) na dose de 240 mg/kg de peso vivo e após comprovação de plano anestésico efetuou-se a técnica. A técnica de transplante, reportada por Ogawa et al. (1997), consiste basicamente na localização dos ductos eferentes e infusão de 15 a 20 µL de uma solução contendo o corante azul de tripan via ductos eferentes, preenchendo assim, a *rete testis* e em seguida os túbulos seminíferos. A agulha utilizada para injeção da solução consistiu de um capilar de borosilicato de 7,5 cm de comprimento, com diâmetro interno de 0,75 mm e externo de 1 mm. O capilar era estirado e seccionado ao meio formando duas agulhas de 3,5 a 4 cm, extremidades afiladas nas pontas, tendo um diâmetro aproximado de 40 µm. O sucesso da técnica foi verificado estimando a porcentagem de preenchimento do corante nos túbulos seminíferos. Após o procedimento, para a maioria dos animais foi efetuada a eutanásia por deslocamento cervical. Alguns animais tiveram a cavidade abdominal suturada e aguardou-se a recuperação dos animais. Estes animais, após aproximadamente uma semana, foram submetidos à eutanásia para avaliar se ocorreu alguma resposta inflamatória ou aderência testicular.

11 RESULTADOS

Após a transformação das células espermatogoniais murinas com o vetor lentiviral, realização do ensaio X-gal e avaliação em microscopia óptica observou-se células LacZ+ como demonstrado na figura 7.

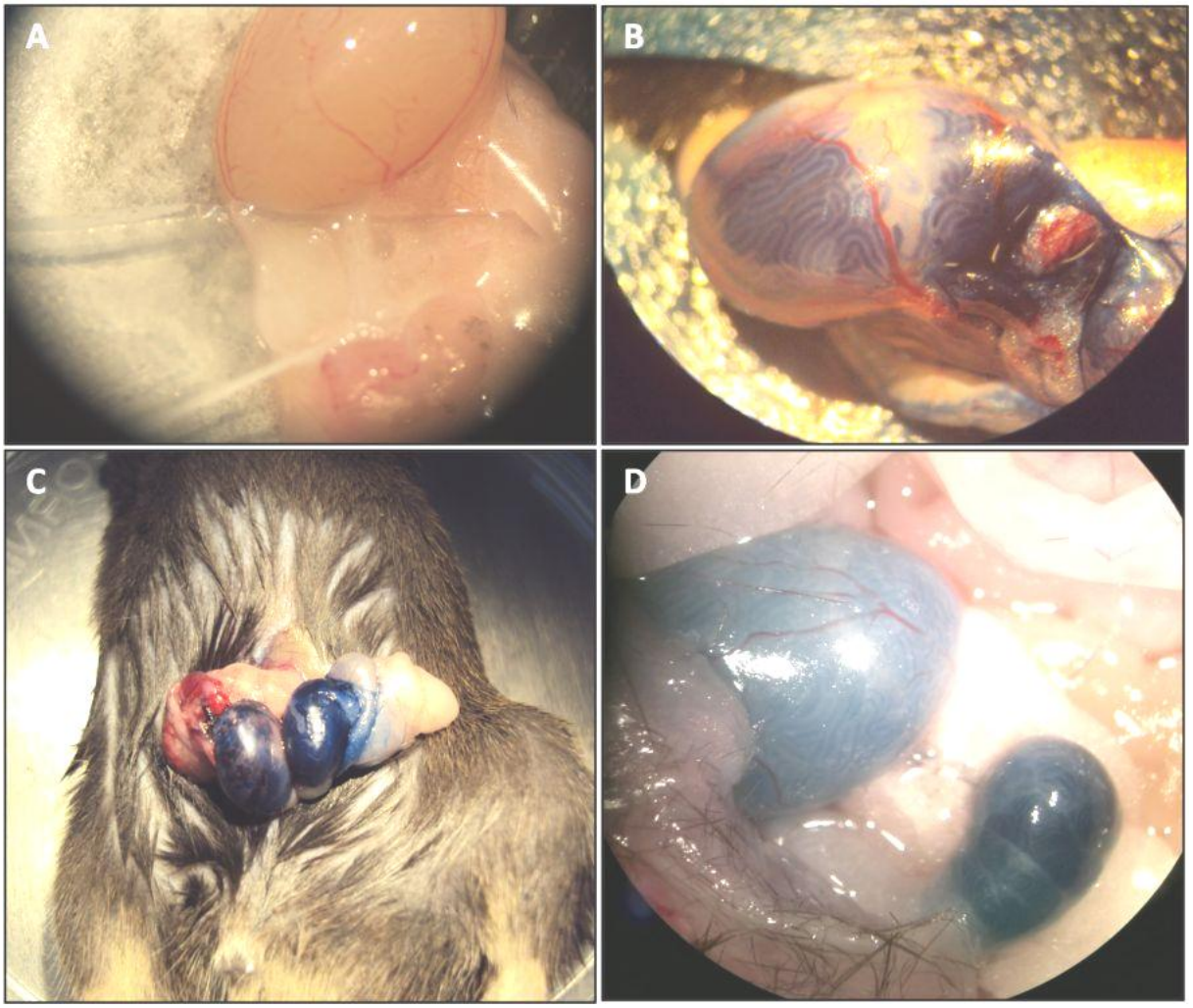
Figura 7 – Fotomicrografia representativa de células espermatogoniais após transformação com vetor lentiviral LV-LacZ e coloração com corante X-gal. Em (A) e (C) células espermatogoniais murinas expressando beta-galactosidase (coradas em azul). Em (B) controle negativo e (C) célula espermatogonial murina que não expressa beta-galactosidase (não corada em azul). Magnificação de 400 x



Fonte: (WORST, R. A.; 2012).

A técnica de injeção testicular através dos ductos eferentes mostrou-se eficiente para o transplante de células espermatogoniais de camundongos. A eficiência de preenchimento dos túbulos seminíferos nas injeções variou de 50 a 90% e a técnica também não promoveu resposta inflamatória (Figura 8).

Figura 8 – Fotografia de testículos murinos após injeção do corante azul de tripan. Em (A) observa-se acima o testículo, abaixo o epidídimo e os ductos eferentes isolados. Em (B), após a injeção com azul de tripan, aproximadamente 70% dos túbulos seminíferos preenchidos. Em (C) camundongo após injeção nos dois testículos. Em (D), após uma semana, observa-se que o corante preencheu a cabeça do epidídimo e a ausência de aderências



Fonte: (WORST, R. A.; 2012).

12 DISCUSSÃO

Atualmente os vetores lentivirais são muito usados na transgenia e apresentam ótimos resultados (NAGANO et al., 2002; BANG-JIM KIM et al., 2012). Para esse projeto inicialmente previa-se a utilização de lipossomos como carreadores do gene interesse. Poucos são os estudos utilizando lipossomos para a TMGT, sendo que foi relatado o uso de lipossomos para transformação de células espermatogoniais *in vivo* (YONEZAWA et al., 2001; XIANG-YANG MIAO; XIN ZHANG, 2011). Devido a escassa literatura relacionada ao uso de lipossomos e a chance de sucesso ser baixa, optou-se pela utilização de vetores lentivirais.

Apesar de ter sido realizado apenas um teste do vetor lentiviral o sucesso foi comprovado com o ensaio de X-gal. A morfologia das células observadas por microscopia óptica indica que as células apresentavam sua membrana celular irregular, mas o fato de células coradas em azul terem sido encontradas somente no grupo de células incubadas com o vetor revela que ocorreu a transformação das células testiculares.

Existem diversas técnicas para o transplante de células espermatogoniais (OGAWA et al., 1997), mas o transplante através dos ductos eferentes é a mais considerada por apresentar ótimos resultados e ser menos invasiva. A realização desta técnica requer muita destreza do manipulador, pois os ductos eferentes devem ser rapidamente isolados do tecido adjacente e posicionados para a introdução da agulha. Nesse momento também se deve ter cuidado para evitar a ruptura dos ductos, pois são estruturas muito frágeis. A utilização do material adequado, pinças de ponta fina e sistema de injeção que consiste de tubos conectados a uma seringa, também é importante para o sucesso do técnica.

Após o domínio da técnica em animais adultos tentou-se injetar em animais mais jovens tratados com o quimioterápico busulfan (Sigma, Cat: B-2635), porém não se obteve sucesso (dados não apresentados). Esses animais, com idade entre 8 e 10 semanas, haviam sido tratados com busulfan 4 semanas antes do transplante. O testículo desses camundongos apresentava-se tão reduzido que o diâmetro da ponta do capilar era maior do que o diâmetro dos ductos eferentes. Capilares com

um diâmetro reduzido foram testados, porém quando não ocorria a ruptura da ponta, a solução contendo azul de tripan acabava obstruindo o mesmo. Para futuros projetos que forem fazer uso da técnica de transplante através dos ductos eferentes deve ser confeccionados capilares de extremidades mais finas e se utilizar de substâncias que diminuam a formação de grumos pelas células, como por exemplo o EDTA.

Portanto, após a realização destas padronizações pode-se concluir que células testiculares de filhotes murinos foram transduzidas com o vetor lentiviral LV-LacZ e que a técnica de transplante de células testiculares através do ducto eferente teve sucesso em camundongos adultos.

CONCLUSÕES

13 CONCLUSÕES

Ao término deste projeto de pesquisa pode-se concluir em relação à primeira fase que foi possível realizar a dissociação e cultivar *in vitro* células germinativas testiculares murinas, mas que são necessárias adequações do protocolo de digestão para incrementar a viabilidade das mesmas. Esse fato pode ter comprometido o plaqueamento diferencial, o qual não apresentou o resultado esperado. E finalmente, o protocolo de congelação mostrou resultado semelhante ao citado pela literatura científica.

No capítulo 2, referente à segunda fase, podemos afirmar que marcador molecular alfa-6 integrina serve de referência para separar populações de células germinativas testiculares por FACS, pois foi detectada a expressão gênica avaliada por RT-PCR quantitativo de ITGα6, GFRα1, Oct-4 e Thy-1. No entanto, não houve diferença estatística de genes marcadores de células-tronco espermatogoniais entre as populações de células com e sem marcação para alfa-6 integrina.

A baixa viabilidade celular obtida nas fases anteriores inviabilizou as etapas de transformação e transplante, mas essas técnicas foram padronizadas e demonstrou-se que células testiculares de filhotes murinos foram transduzidas com o vetor lentiviral LV-LacZ. E por fim, a técnica de transplante de células testiculares através do ducto eferente teve sucesso em camundongos adultos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALIPOOR, F. J.; GILANI, M. A. S.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; HAMPA, 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.

BANG-JIN KIM; KI-JUNG KIM; YONG-HEE KIM; YONG-AN LEE; BYUNG-GAK KIM; CHUL MIN CHO; HYE-RYEON KANG; CHUL GEUN KIM; BUOM-YONG RYU. Efficient enhancement of lentiviral transduction efficiency in murine spermatogonial stem cells. **Mol Cells**, v. 33, p. 449-455, 2012.

BELLVÉ, A. R.; CAVICCHIA, J. C.; MILLETFE, 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 Acad Sci**, v. 91, p. 11303-11307, 1994.

BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, p. 11298-11302, 1994.

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

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.

BUOM-YONG RYU; ORWIG, K. E.; OATLEY, J. M.; CHIH-CHENG LIN; LUNG-JI CHANG; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. **J Androl**, v. 28, n. 2, p. 353-360, 2007.

CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **Amer J Anat**, v. 100, p. 241-267, 1957.

DE BARROS, F. R. O.; WORST, R. A.; SAURIN, G. C. P.; MENDES, C. M.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. α-6 integrin expression in bovine spermatogonial cells purified by discontinuous percoll density gradient. **Reprod Domest Anim**, v. 47, n. 6, p. 887-890, 2012.

DE ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. **Int J Exp Pathol**, 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.

DE ROOIJ, D. G.; MIZRAK, S. C. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. **Development**, v. 135, p. 2207, 2008.

DETTIN, L.; RAVINDRANATH, N.; HOFMANN, M. C.; DYM, M. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. **Biol Reprod**, 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.

GANDOLFI, F. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. **Transgenic research**, v. 7, p. 147-155, 1998

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.

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. **Fert Steril**, v. 96, p. 286-290, 2011.

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, 1971a.

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cell cycle properties. **Cell Tissue Kinet**, v. 4, n. 4 p. 313-334, 1971b.

HYNES, R. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.

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.; WONG, J.; MAKI, C.; PACCHIAROTTI, J.; RAMOS, T.; HOWERTON, K.; YUEN, C.; GREILACH, S.; ZHAO, H. H.; CHOW, M.; CHOW, Y. C.; RAO, J.; BARRITT, J.; BAR-CHAMA, N.; COPPERMAN, A. Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. **Human**, v. 26, p. 1296-1306, 2011.

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. **Biol Reprod**, 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. **Biol Reprod**, v. 72, p. 985-991, 2005.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 6487-6492, 2003.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. **Proc Natl Acad Sci**, 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. **Biol Reprod**, v. 71, p. 722-731, 2004b.

KUBOTA, H.; BRINSTER, R. L. Technology insight: in vitro culture of spermatogonial stem cells and their potencial therapeutic uses. **Nature Clin Prac**, v. 2, n. 2, p. 99-108, 2006.

KUIJK, E. W.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. The effects of growth factors on *in vitro*-cultured porcine testicular cells. **Reproduction**, v. 138, p. 721, 2009.

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

MAIONE, B.; LAVITRANO, M.; SPADAFORA, C.; KIESSLING, A. A. Sperm-mediated gene transfer in mice. **Mol Reprod Dev**, v. 50, n. 4, p. 406-409, 1998.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; KERR, J. B.; KRETSER, 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.

MINTZ, B.; RUSSELS, E.S. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. **J Exp Zool**, 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.; WATSON, D. J.; BUOM-YONG RYU; WOLFE, J. H.; BRINSTER, R. L. Lentiviral vector transduction of male germ line stem cells in mice. **FEBS Letters**, v. 524, p. 111-115, 2002.

NAGANO, M.; BUOM-YONG RYU; BRINSTER, C. J.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. **Biol Reprod**, 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.

OATLEY, J. M.; OATLEY, M. J.; AVARBOCK, M. R.; TOBIAS, J. W.; BRINSTER, R. L. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulatator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. **Development**, v.136, p. 1191-1199, 2009.

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.

OHBO, K.; YOSHIDA, S.; OHMURA, M.; OHNEDA, O.; OGAWA, T.; TSUCHIYA, H.; KUWANA, T.; KEHLER, J.; ABE, K.; SCHÖLER, H. R.; SUDAA, T. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. **Develop Biol**, v. 258, p. 209-225, 2003.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. Oct-4: Control of totipotency and germline determination. **Molec Reprod Develop**, v. 55, p. 452-457, 2000.

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, 1990, p.119-161.

RYAN, A. K.; ROSENFELD, M. G. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. **Genes Dev**, v. 11, p. 1207-1225, 1997.

SALANOVA, M.; STEFANINI, M.; DE CURTIS, I.; PALOMBI, F. Integrin receptor alpha 6 beta 1 is localized at specific sites of cell-to-cell contact in rat seminiferous epithelium. **Biol Reprod**, v. 52, p. 79-87, 1995.

SATO, M.; IWASE, R.; KASAI, K.; TADA, N. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer. **Anim Biol**, v. 5, p. 19-31, 1994.

SEHGAL, L.; THORAT, R.; KHAPARE, N.; MUKHOPADHAYA, A.; SAWANT, M.; DALAL, S. N. Lentiviral mediated transgenesis by in vivo manipulation of spermatogonial stem cells. PLos One, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2011.

SHINOHARA, T.; AVARBOCK, M.; BRINSTER, R. L. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, p. 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. **Proc Natl Acad Sci**, 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 Acad Sci**, 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. **Fertil Steril**, v. 95, p. 2399-2403, 2011.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 58-62, 1988.

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 Molec Mechan Mutagen**, v. 290, p. 193-200, 1993.

TRUPP, M.; RYDÉN, M.; JÖRNVALL, H.; FUNAKOSHI, H.; TIMMUSK, T.; ARENAS, E.; IBÁÑEZ, C. F. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. **J Cell Biol**, v. 130, p. 137-148, 1995.

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. **Biol Reprod**, 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. **Biol Reprod**, 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.

XIANG-YANG MIAO; XIN ZHANG. Production of transgenic mice carrying the Thanatin gene by intratesticular injection. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 415, p. 429-433, 2011.

XIANG WANG; QIANG DING; YUANFANG ZHANG; HUILIN WANG; LIANGHONG MA; XIAYANG XIE. Two allogeneic descendents derived from the highdose busulfan-treated infertile mouse model after freeze-thawed spermatogonial stem cell transplantation. **Fertil Steril**, v. 90, n.2, p. 1538-1549, 2008.

XIAOJUAN MENG; LINDAHL, M.; HYVÖNEN, M. E.; PARVINEN, M.; DE ROOIJ, D. G.; HESS, M. W.; RAATIKAINEN-AHOKAS, A.; SAINIO, K.; RAUVALA, H.; LAKSO, M.; OUTROS. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. **Science**, v. 287, p. 1489-1493, 2000.

YOMOGIDA, K.; YAGURA, Y.; TADOKORO, Y.; NISHIMUNE, Y. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse sertoli cells. **Biol Reprod**, v. 69, p. 1303-1307, 2003.

YONEZAWA, T.; FURUHATA, Y.; HIRABAYASHI, K.; SUZUKI, M.; TAKAHASHI, M.; NISHIHARA, M. Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer. **Mol Reprod Develop**, v. 60, p. 196-201, 2001.

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

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – DMEM digestão

- DMEM (GIBCO; cat: 11965-092)
- 14 mM $NaHCO_3$ (Sigma; cat: S5761)
- 4 mM L-glutamina (Sigma; cat: G8540)
- 15 mM de Hepes (Sigma; cat: H6147)
- 1% (v/v) solução de aminoácidos não-essenciais (Sigma; cat: M7145)
- 100 UI/ mL de penicilina (Sigma; cat: P3032)
- 100 µg/ mL de estreptomicina (Sigma; cat: S6501)
- 40 µg/ mL de gentamicina (Sigma; cat: G1264)
- 1 mg/ mL de hialuronidase tipo I-S (Sigma; cat: H3506)
- 1 mg/ mL de colagenase IV (Sigma; cat: C5138)
- 1 mg/ mL de tripsina (Gibco; cat: 27250-018)

ANEXO B – DMEM cultivo

- DMEM (Invitrogen; cat: 11965-092)
- 1,1163mg/ mL $NaHCO_3$ (Sigma; cat: S5761)
- 0,5846 mg/ mL L-glutamina (Sigma; cat: G8540)
- 1% (v/v) solução de aminoácidos não-essenciais (Sigma; cat: M7145)
- 100 UI/ mL de penicilina (Sigma; cat: P3032)
- 40 µg/ mL de gentamicina (Sigma; cat: G1264)
- 60 mg/ mL BSA (Sigma; cat: 232-936-2)

ANEXO C – DMEM congelação

- DMEM (Invitrogen; Cat 11965-092)
- 1,1163mg/ mL $NaHCO_3$ (Sigma; cat: S5761)
- 0,5846 mg/ mL L-glutamina (Sigma; cat: G8540)
- 1% (v/v) solução de aminoácidos não-essenciais (Sigma; cat: M7145)
- 100 UI/ mL de penicilina (Sigma; cat: P3032)
- 40 µg/ mL de gentamicina (Sigma; cat: G1264)
- 40% (v/v) de FCS (Gibco; cat: 12657-029)
- 3 mol/ mL de DMSO (Sigma; cat: D5879)

ANEXO D – Ensaio de X-gal

- 0,1 mM $NaPO_4$ (Invitrogen; cat: 11965-092)
- 3 mM K3 (Sigma; cat: P8131)
- 3 mM K4 (Sigma; cat: P3289)
- 1 mg/ mL X-gal (Boehringer Mannheim; cat: 745-740)
- 1,2 mM $MgCl_2$ (Sigma; cat: M8266)