

## Bioengenharia: transplante de células-tronco espermatogoniais em mamíferos

*Vanessa Mendieta Reis*<sup>1\*</sup>, *Heloísa Ester Andrade Alves Ribeiro*<sup>2</sup>,  
*Victoria Veiga Alves*<sup>3</sup>, *Cristiano Oliveira Pereira*<sup>4</sup>,  
*Ariane Maria Almeida Siqueira*<sup>5</sup>, *João Bosco Barreto Filho*<sup>6</sup>

**Resumo:** O transplante de espermatogônias tronco (SSCs, do inglês Spermatogonial Stem Cell) é uma biotecnologia que consiste na transferência de células tronco testiculares de um doador fértil para um receptor cuja espermatogênese endógena foi suprimida. Essa técnica pode ser aplicada para a produção de machos que gerem uma progênie com características genóticas do doador selecionado. Especialmente na bovinocultura, tanto de leite como de corte, o transplante de SSCs tem o potencial de substituir a inseminação artificial (IA). Pode-se também, colocar SSCs de um mesmo doador (de genética superior) em mais de um receptor o que aumentaria o número de filhos desse doador. Além disso, possui outras aplicações como a restauração da fertilidade em homens após o tratamento de câncer, conservação de espécies ameaçadas de extinção e tratamento de causas específicas de infertilidade. Assim, com esta revisão tem-se como propósito discorrer acerca de uma biotecnologia da reprodução que permitirá a propagação do valor genético de doadores de sêmen considerados de alto valor zootécnico.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, Genética, Reprodução, Espermatogônia, Fertilidade.

---

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Faculdade de Zootecnia e Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-1737-0636>

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Faculdade de Zootecnia e Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-4618-4792>

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Faculdade de Zootecnia e Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-7370-9518>

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Faculdade de Zootecnia e Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-4373-5467>

<sup>5</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Faculdade de Zootecnia e Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-9298-7620>

<sup>6</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Faculdade de Zootecnia e Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-3573-4883>

\*Autor Correspondente: Departamento de Medicina Veterinária - Faculdade de Zootecnia e Veterinária, Universidade Federal de Lavras – CP 3037, UFLA, Campus Universitário Lavras, Minas Gerais CEP: 37.200-900.

## **Introdução**

Com o crescimento populacional observado nas últimas décadas, a demanda por produtos de origem animal cresceu acentuadamente, levando a uma alta expansão do setor agropecuário (CHEN; ABLER, 2014). Esse cenário requer a produção de uma quantidade suficiente de animais e para isso é fundamental que estes tenham uma reprodução eficiente (GIASSETTI; CICCARELLI; OATLEY, 2019).

Bioteχνologias reprodutivas são desenvolvidas com esse objetivo e é o caso do transplante de SSCs, que foi relatado pela primeira vez em ratos (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994). O êxito da técnica em ratos possibilitou, posteriormente, a sua utilização, como uma forma alternativa de transgenia, em animais de criação como os caprinos (HONARAMOOZ et al., 2003a), suínos (HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002) e bovinos (IZADYAR et al., 2003; JOERG et al., 2003).

É sabido que os mamíferos são capazes de produzir milhões de espermatozoides através das SSCs (GRISWOLD, 2016). Estas células, por sua vez, podem ser transplantadas para colonizarem o testículo de outro macho originando progênes com características genéticas do doador (GOTTARDO et al., 2019). Sendo assim, o transplante destas células se tornou uma promissora ferramenta a ser utilizada na produção animal.

### **Espermatogênese**

Grande parte dos organismos possuem duas linhagens de células, as somáticas e as germinativas. As somáticas compõem a maioria dos tecidos, responsáveis pelo funcionamento do indivíduo. As germinativas compreendem os espermatozoides e os ovócitos, produzidos no macho e na fêmea, respectivamente (APONTE, 2015).

A espermatogênese é um processo cíclico e sequencial de diferenciação das células espermatogoniais (SAHARE; SUYATNO; IMAI, 2018), que por

divisão mitótica originam os espermatócitos. Esses, por sua vez, por meio de divisão meiótica, dão origem à espermatídes haploides, que se diferenciam em espermatozoides. Para o bom desenvolvimento da espermatogênese é necessário o suporte funcional das células de Sertoli, hormônios esteroides, gonadotrofinas e fatores de crescimento. As células de Sertoli mantêm um íntimo contato estrutural e de sinalização durante todo o processo de espermatogênese. Essas células formam a barreira hemato-testicular que distingue os compartimentos basal e albuminal dos túbulos seminíferos através de especializações ectoplásmicas e junções dos tipos desmossoma e comunicante (APONTE, 2015).

### **Desenvolvimento das células tronco espermatogoniais**

Durante o período embrionário as células germinativas primordiais (PGCs) migram para a crista gonadal do feto e se transformam em gonócitos. Nos bovinos, quatro meses depois do nascimento, esses gonócitos retomam a mitose, vão para a lâmina basal do túbulo seminífero e transformam-se em células tronco espermatogoniais (ZHENG et al., 2014).

Em 1971, Huckins após estudar e observar espermatogônias na lâmina basal do túbulo seminífero de ratos, propôs que haveria uma organização de forma hierárquica entre as espermatogônias. Nesse modelo sugeriu-se que as espermatogônias *A single* ( $A_s$ ) sofreriam divisão celular gerando duas células idênticas que poderiam migrar para longe uma das outras, ficando isoladas e se auto replicar, ou ficar juntas, formar sincícios e dar origem às espermatogônias *A paired* ( $A_{pr}$ ). Estas se dividiriam novamente e formariam mais sincícios entre si, gerando as espermatogônias *A aligned* ( $A_{al}$ ), que apresentariam quatro a dezesseis células juntas (HUCKINS, 1971). Nesse modelo considera-se que tanto as  $A_{pr}$  quanto as  $A_{al}$ , seriam incapazes de fazer auto regeneração e só as  $A_s$  são classificadas como células tronco espermatogoniais (ROOIJ; RUSSELL, 2000; ROOIJ, 2017).

Porém, um outro modelo alternativo ao de Huckins, propôs que os processos de produção de espermatogônias não são unidirecionais e a autorregeneração muda de acordo com a necessidade de células germinativas para o epitélio seminífero. Então, tanto as  $A_s$ , as  $A_{pr}$  e as  $A_{al}$  tem capacidade de atuar como célula-tronco (HARA et al., 2014; YOSHIDA, 2012; YOSHIDA, 2018).

Em bovinos, as células  $A_{al}$ , podem dar origem às células diferenciadas, por meio de seis divisões celulares progressivas. A primeira divisão forma a  $A_1$ , depois  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ,  $I_n$  (intermediária) e as espermatogônias  $B$ , que são aquelas que darão origem aos espermátócitos primários, terminando assim a divisão espermatogonial (IZADYAR et al., 2011).

### **Transplante de Células Germinativas Espermatogoniais**

O transplante de SSCs é uma biotecnologia que consiste na transferência de células tronco do testículo de um doador fértil para o testículo de um receptor cuja espermatogênese foi artificialmente suprimida. Estima-se que uma única SSC pode dar origem a mais de 4 mil espermatozoides e que, em mamíferos, milhões de espermatozoides são produzidos todos os dias a partir delas. Ademais estas células têm capacidade de se replicar nos túbulos seminíferos após um transplante e participar da espermatogênese no testículo receptor. Somando estes dois conhecimentos sobre as SSCs, busca-se a aplicação da técnica para produção de machos que gerem uma progênie com características genótípicas do doador selecionado (MEISTRICH ML, 1993).

A técnica, quando realizada entre indivíduos da mesma espécie, é denominada alotransplante. Inicia-se com a biopsia testicular do animal selecionado e após a coleta, o material deve ser manipulado em laboratório. Como as SSCs representam uma pequena fração do total de células dos testículos, cerca de 0,01% (CHAN et al., 2014; HELSEL et al., 2017), é indispensável o cultivo e seleção *in vitro* para incrementar o seu número e diminuir a quantidade de células somáticas e germinativas “contaminantes”

(MCLEAN, 2008; HILL; DOBRINSKI, 2006; DOBRINSKI, 2005). Dentre as principais técnicas utilizadas para a purificação temos: 1) seleção por fluorescência (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009) ou campo magnético; 2) velocidade de sedimentação seguida de plaqueamento diferencial (LUO J, MEGEE S, RATHI R, 2006); e 3) gradiente de Percoll (VAN PELT et al., 1996). Após a purificação as SSCs podem seguir no processo (NAGANO; AVARBOCK; BRINSTER, 1999) ou serem criopreservadas para um transplante posterior (AVARBOCK; BRINSTER; BRINSTER, 1996).

Em seguida às manipulações *in vitro*, deve ser feita a preparação do animal que irá receber as SSCs. O microambiente testicular dos animais receptores tem um papel crucial na dinâmica e no desenvolvimento das SSCs transplantadas. Por isso, deve-se garantir a existência de nichos de SSCs do doador, disponíveis para a colonização do testículo receptor. Assim, o receptor desejado é aquele que não apresenta SSCs próprias e seu epitélio seminífero seja formado unicamente por células de Sertoli (BRINSTER et al., 2003). Como os animais receptores apresentam SSCs próprias no momento do transplante, se torna necessária a eliminação das SSCs endógenas para que não ocorra uma mistura de espermatozoides do doador e receptor após um transplante bem-sucedido. Para controlar a espermatogênese no testículo receptor pode-se usar quimioterápicos, como o busulfan (OGAWA et al., 1997) e a irradiação dos testículos (HERRID et al., 2006), sendo o primeiro tratamento o mais utilizado (BRINSTER et al., 2003; HONARAMOOZ et al., 2005).

Entretanto, o sucesso dessas duas técnicas somente foi observado em roedores e, possivelmente, não são viáveis em grandes animais, como suínos e bovinos. O busulfan é um agente alquilante que induz a apoptose nas células em divisão e a sua eficácia em esgotar as SSCs depende da dose utilizada, podendo levar à quadros de anemia devido ao efeito colateral nas células-tronco da medula óssea (OATLEY, 2018). Além disso, o busulfan é eliminado através das fezes e da urina por um longo período, representando uma

preocupação com biossegurança. A segunda abordagem é a irradiação testicular por feixe de fótons, que não representa um risco biológico. Porém a elevada massa testicular do animal de grande porte adulto exige uma alta dose para eliminar todas as SSCs endógenas. Pode haver danos à população de células de Leydig, fato que se torna uma limitação da técnica, pois a testosterona produzida por essas células, tem papel importante na restauração da espermatogênese após o transplante (HERRID et al., 2006). Considerando os fatores relacionados à aplicação do busulfan e à irradiação, conclui-se que ambos podem não ser as abordagens de eleição para grandes animais, demandando outros meios para a preparação destes receptores (OATLEY, 2018).

Como alternativa para a produção de receptores, por meio da eleição de genes com a tecnologia CRISPR / Cas9, se tornou possível a produção de suínos com mutações inativadoras do gene NANOS 2 (PARK et al., 2017). A inibição desse gene leva, especificamente, à esterilidade masculina devido à apoptose de pré-espermatogonias precursoras das SSCs no período neonatal (TSUDA et al., 2016; SUZUKI; TSUDA; SAGA, 2007). Nesses animais a biópsia testicular revelou eliminação completa da linhagem germinativa, porém com túbulos seminíferos intactos e secreção normal de testosterona (PARK et al., 2017). Por isso, bovinos “*Knockout NANOS2*” são, provavelmente, o modelo receptor perfeito para o transplante de SSCs. Para isso, é fundamental demonstrar que os testículos destes machos são capazes de aceitar o transplante e regenerar a espermatogênese. Essa abordagem deve ser objeto de pesquisa nos próximos anos e permitir o desenvolvimento da ideia de “touro substituto” como uma nova ferramenta reprodutiva em sistemas de produção (OATLEY, 2018).

Finalmente, as células são transplantadas, podendo ser depositadas através de micropipetas, diretamente nos túbulos seminíferos (BRINSTER; AVARBOCK, 1994; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; CLOUTHIER et al., 1996), nos ductos eferentes (OGAWA et al., 1997) ou na *rete testis*, através de

canulação guiada por ultrassonografia, mostrando ser essa a melhor via de transplante em animais de grande porte (SCHLATT et al., 1999; HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002; HONARAMOOZ et al., 2003a; HONARAMOOZ et al., 2003b). Um corante, o azul de Tripán, é utilizado para monitorar a viabilidade das células germinativas e o percentual de túbulos seminíferos preenchidos pela suspensão contendo as SSCs (HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002; OGAWA et al., 1997).

Para a verificação do sucesso do transplante, é necessário identificar as células germinativas transplantadas. Em camundongos, cerca de dois meses após o transplante, foi possível identificar espermátides originadas das espermatogônias tronco dos doadores (PARREIRA et al., 1998). Essa identificação pode ser feita com base em genes exógenos incorporados às SSCs que atuam como marcadores, por exemplo, o “LacZ”, oriundo da *Escherichia coli*, que permite à célula se corar de azul através de técnicas de coloração específicas (BRINSTER; AVARBOCK, 1994). Pode-se também, lançar mão de um corante simples, por exemplo, o “PKH26” (*Red Fluorescent Cell Linker*), que quando adicionado à suspensão contendo as SSCs se intercala na bicamada lipídica da membrana celular e quando exposto à luz de cor vermelha, permite a identificação das células injetadas por até alguns meses (HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002).

### **Transplante de SSCs em Animais Domésticos**

O transplante de SSCs representou um grande avanço nos estudos das interações entre as células germinativas. Com a realização dessa técnica, Brinster, professor de Fisiologia Reprodutiva na Escola de Medicina Veterinária da Universidade da Pensilvânia, abriu uma gama de possibilidades, como o transplante de SSCs singênicos, entre animais de mesma espécie e xenogênicos, entre animais de espécies diferentes (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; JOHNSTON; RUSSELL; GRISWOLD, 2000). Para este relato, foram usados ratos machos cujas células foram

implantadas nos túbulos seminíferos de receptores que já haviam tido suas células germinativas eliminadas utilizando busulfan. Meses depois observou-se um extraordinário resultado, onde foram gerados descendentes com genótipo dos doadores a partir do acasalamento natural de fêmeas com os machos receptores (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994).

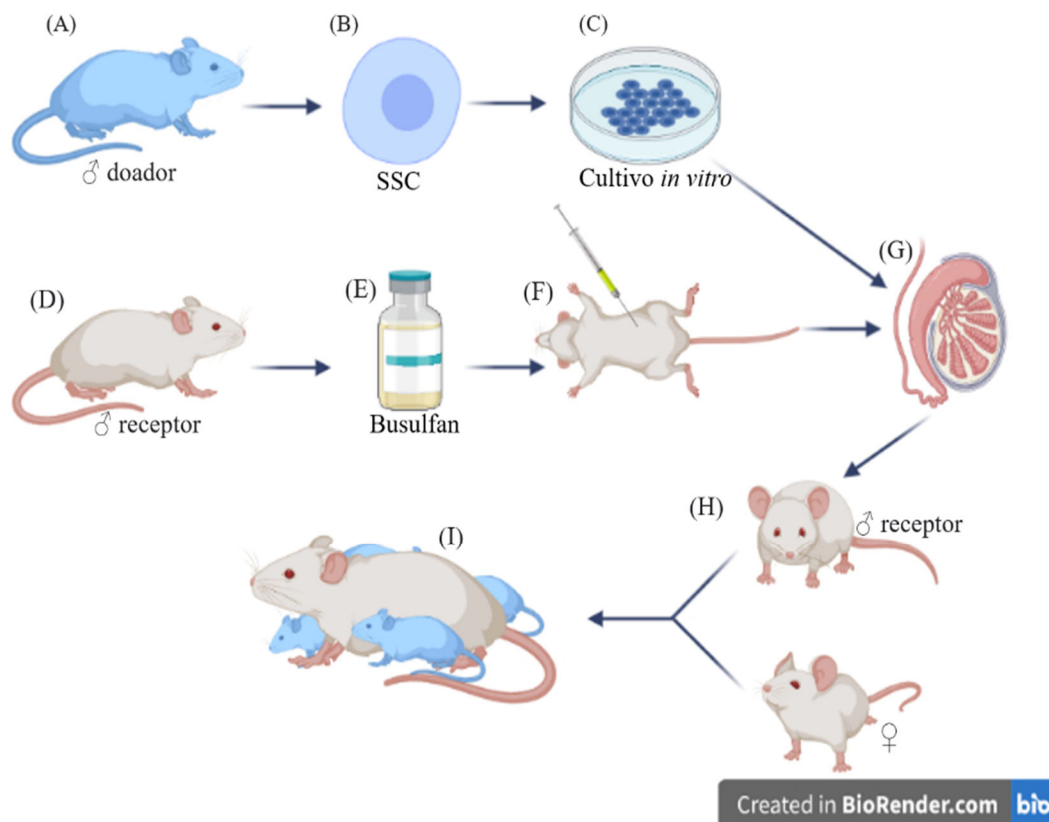


Figura 1. Transplante de SSCs em ratos. O macho doador contém genes marcadores incorporados às SSC, permitindo que essas células sejam coradas de azul (Ae B). As SSCs são cultivadas *in vitro* (C) e, posteriormente, devem ser transplantadas em um macho receptor infértil. Para que esse macho fique infértil, ele é tratado com busulfan pela via intraperitoneal e dessa forma quase todas suas SSCs são destruídas (D) (E) (F). As SSCs cultivadas são injetadas diretamente no túbulo seminífero do receptor (G). O macho receptor realiza acasalamento natural com uma fêmea (H) e gera descendentes com genótipo do macho doador (I) (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994).

Para entender como acontecia a espermatogênese nos testículos dos receptores após o transplante, SSCs de ratos doadores recém-nascidos foram transplantadas para o lúmen dos túbulos seminíferos de receptores adultos.



A partir daí foi observada uma sincronização entre as células germinativas do doador e do receptor, sugerindo que a espermatogênese pós-transplante é regulada pelo microambiente intraluminal (JIANG; SHORT, 1995).

O aprimoramento da técnica abriu um leque de possibilidades e uma delas foi o transplante xenogênico, que foi relatado pela primeira vez em 1996. Utilizando ratos doadores, o transplante de SSCs foi feito em camundongos imunodeficientes e estes conseguiram desenvolver a espermatogênese, sendo observados espermatozoides característicos de rato no epidídimo de camundongos (CLOUTHIER et al., 1996).

Para verificar formas de preservação das SSCs, estudos com o congelamento dessas células foram feitos. Essa possibilidade foi constatada quando SSCs de camundongos pré-púberes e adultos foram isoladas e congeladas por 4 a 156 dias, a -196 °C e, após o descongelamento, foram capazes de concluir a espermatogênese nos túbulos seminíferos receptores (AVARBOCK; BRINSTER; BRINSTER, 1996).

A partir daí a descrição da técnica tornou-se necessária para que pudesse ser implementada nas diversas áreas do conhecimento. Em 1997 um relato da técnica foi publicado, onde os autores descreveram que além de injetar as SSCs diretamente nos túbulos seminíferos, elas também podiam ser injetadas via *rete testis*, chegando, posteriormente, aos túbulos, ou por meio de um ducto eferente, neste último, a pressão da injeção empurrava as SSCs para dentro dos túbulos seminíferos (OGAWA et al., 1997).

A fim de quantificar a colonização das SSCs no testículo receptor, foi desenvolvido um sistema de morfometria assistida por computador capaz de identificar as espermatogoneas nos testículos com a cor azul, sendo possível medir a colonização das SSCs em área, número de células e o comprimento do túbulo corado. Com esse sistema, foi possível determinar a relação entre o número de SSCs transplantadas e a eficiência da colonização pelas mesmas, tendo como resultado que um transplante de 100.000 a 1.000.000 de células

era capaz de resultar na espermatogênese e que apenas 10% das SSCs transplantadas colonizavam o testículo receptor (DOBRINSKI et al., 1999).

Com o intuito de adquirir conhecimento sobre o comportamento das SSCs pós-transplante, Nagano; Avarbock; Brinster, 1999, analisaram o padrão de colonização espermatogonial nos testículos de camundongos durante quatro meses após o transplante. Constataram que esse processo poderia ser dividido em três fases: primeiramente as SSCs transplantadas se distribuíram aleatoriamente pelos túbulos sendo que uma pequena parte delas atingiu a membrana basal, em segundo, passado de uma semana a um mês, as SSCs se dividiram e formaram uma monocamada e em terceiro, a partir de um mês, as células se diferenciaram e iniciaram a espermatogênese. Durante o período analisado, as SSCs formaram colônias que cresciam lateralmente e repetiam as fases dois e três, e de um total de 1 milhão de células transplantadas, dezenove colônias em média foram formadas. Isso permitiu uma visão mais clara da espermatogênese e de como todo esse processo ocorria (NAGANO; AVARBOCK; BRINSTER, 1999).

A evolução da técnica permitiu a aplicação do transplante de SSCs em outras espécies de animais além dos roedores, como macacos (SCHLATT et al., 1999; EHMCKE; LUETJENS; SCHLATT, 2005), suínos (HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002), caprinos (HONARAMOOZ et al., 2003a) e bovinos (IZADYAR et al., 2003; HERRID et al., 2006; STOCKWELL et al., 2009a), mas apesar de existirem pesquisas de aplicação do transplante de SSCs em animais de grande porte, o sucesso da técnica ainda se encontra restrito, por isso ainda é necessário mais investigações (GRISWOLD; MCLEAN; RUSSELL, 2001; OATLEY, 2018).

### **Animais de produção**

Nos animais de produção, a técnica do transplante de SSCs pode ser uma alternativa à inseminação artificial (HILL; DOBRINSKI, 2006). A produção de descendentes utilizando esta técnica já foi possível em caprinos

(HONARAMOOZ et al., 2003a), isso ainda não ocorreu no caso de suínos e bovinos (DOBRINSKI, 2005).

Ao empregar a técnica em larga escala, por meio da cultura de células, é possível aumentar a disponibilidade do uso de reprodutores de elite e a existência de uma fonte renovável de SSCs de alta qualidade genética (HILL; DOBRINSKI, 2006).

A IA utilizando sêmen de varrões criados na própria granja onde estão as matrizes é a ferramenta reprodutiva mais utilizada na suinocultura (GIASSETTI; CICCARELLI; OATLEY, 2019). É um ponto negativo, pois não permite o uso de genéticas superiores, como no caso do comércio de sêmen (RIESENBECK, 2011). O sêmen do varrão possui pouca resistência à criopreservação (SILVA et al., 2015), dessa forma, o uso do transplante de SSCs pode ser uma alternativa para esse tipo de produção (GIASSETTI; CICCARELLI; OATLEY, 2019).

Na produção de pequenos ruminantes o uso da IA é desafiador devido às características anatômicas destas espécies. Sendo assim, a aplicação do transplante de SSCs pode ser promissora, permitindo um maior ganho genético do rebanho e facilitando o manejo para alcançar esse ganho, além disso, existe a possibilidade do uso dessa técnica para gerar descendentes híbridos para maior produção de carne em diferentes regiões do mundo, sem necessariamente ser preciso usar o próprio animal (GIASSETTI; CICCARELLI; OATLEY, 2019).

### **Bovinocultura**

O transplante de SSCs em bovinos foi descrito pela primeira vez em 2003. Neste trabalho foram utilizados quatorze bezerros, metade deles foi hemicastrado para realizar transplante autólogo e a outra metade foi utilizada para transplante homólogo. Foram isoladas 1.000.000 células/g em 20 g dos testículos castrados, sendo 70% destas espermatogônias do tipo A, que foram congeladas até o transplante. Dois meses e meio após o transplante,

os bezerros receptores foram castrados e seus testículos examinados, constatando-se a presença de 80% de espermatogônias A, 60% de espermatócitos, 30% de espermátides e 15% de espermatozoides nos túbulos seminíferos. Nesse trabalho foi demonstrado pela primeira vez o sucesso do transplante autólogo na espécie bovina, não havendo o mesmo resultado no transplante homólogo (IZADYAR et al., 2003).

Para investigar se o transplante de SSCs heterólogas era possível entre taurinos e zebuínos, um estudo foi realizado. Oito bezerros *Bos taurus taurus* foram utilizados como doadores e suas SSCs foram transplantadas em quinze bezerros *Bos taurus indicus*. As SSCs foram marcadas com corante fluorescente para que pudessem ser identificadas. Após duas a trinta semanas, os receptores foram castrados e seus testículos analisados. Foram observadas células derivadas dos doadores em 60% deles, indicando que o transplante entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* é possível (HERRID et al., 2006).

Stockwell et al., 2009b utilizaram alguns dos animais do trabalho de Herrid et al., 2006, para identificar marcadores microssatélites capazes de diferenciar o genótipo de indivíduos diferentes, podendo ser utilizado para detectar a existência do DNA do doador no sêmen do receptor. O sêmen dos receptores foi coletado 52 - 98 semanas após o transplante e todas as amostras foram positivas para DNA dos doadores, porém a porcentagem de espermatozoides do doador no ejaculado do receptor diminuiu com o tempo pelo fato de algumas das SSCs terem sido rejeitadas pelo receptor. Este resultado foi bastante promissor, demonstrando que o transplante de células germinativas pode trazer grandes benefícios à produção de bovinos (STOCKWELL et al., 2009b), contudo os machos receptores não tiveram suas células totalmente eliminadas antes do transplante, o que dificulta a interpretação dos resultados e isso demonstra que é necessário desenvolver uma técnica capaz de produzir receptores eficazes (GIASSETTI; CICCARELLI; OATLEY, 2019).

## Outras Aplicações

### **Tratamento da infertilidade**

A infertilidade masculina é um problema importante em muitas áreas, tanto na medicina humana como veterinária e na conservação de animais ameaçados de extinção. Em média, 7 % dos homens sofrem de infertilidade (KRAUSZ, 2011) e os animais de produção de alto valor genético muitas vezes podem sofrer de problemas na espermatogênese (UCHIDA; DOBRINSKI, 2017).

A subfertilidade é um dos principais efeitos colaterais da quimioterapia, devido à alta sensibilidade das espermatogônias à tratamentos citotóxicos, gerando apoptose espermatogonial (MARVIN L. MEISTRICH, 2013). A dosagem e tipo de tratamento na terapia do câncer determina o grau de azoospermia no homem (HOWELL; SHALET, 2005), sendo que 25% dos pacientes que passaram por tratamentos oncológicos apresentam azoospermia após 40 meses em média (TOMLINSON et al., 2015). Geralmente quando o câncer é diagnosticado, o homem já possui diminuição de fertilidade, sendo que 12% dos pacientes que optam por congelar o sêmen, já estão azoospérmicos (RAGNI et al., 2003).

Ainda que o transplante de células tronco espermatogoniais exija uma biópsia do testículo do paciente oncológico, esse método permitiria a concepção natural, evitando o uso de fertilização *in vitro*. Dessa forma, o transplante de células tronco espermatogoniais pode ser uma boa alternativa para preservação da fertilidade de pacientes oncológicos (MULDER et al., 2016).

Um estudo recente coletou amostras de tecido testicular de homens azoospérmicos que foram congeladas, descongeladas e, posteriormente, isoladas suas SSCs e transplantadas em ratos adultos. Após oito semanas foi detectado maior número de espermatogônias, espermatócitos e espermátides nesses animais. Por meio de estudos imuno-histoquímicos constatou-se a produção de proteínas de natureza humana por estas células, demonstrando

que o congelamento lento de SSCs pode induzir a espermatogênese e produção de células haploides após o transplante (MOHAQIQ et al., 2019).

### **Conservação de SSCs de espécies ameaçadas de extinção**

Alternativas capazes de auxiliar na preservação de espécies ameaçadas são cada vez mais necessárias. O transplante de SSCs tem um grande potencial nessa questão, permitindo que as SSCs preservadas desses animais possam, um dia, dar origem à descendentes e aumentar as populações que hoje se encontram ameaçadas (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2019).

Uma das famílias de animais mais ameaçadas quanto a questão de conservação é a Felidae, estando somente o gato doméstico (*Felis catus*) fora desse risco. A fim de avaliar a efetividade do uso do gato doméstico como receptor de células germinativas de felídeos selvagens, o transplante de SSCs de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) foi realizado. Essa experiência demonstrou sucesso, sendo o gato doméstico capaz de desenvolver e formar células germinativas maduras de jaguatirica, indicando que é um receptor adequado para o transplante espermatogonial (SILVA et al., 2015).

Um peixe conhecido no Brasil, a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), se encontra ameaçado de extinção devido ao bloqueio das rotas de migração, fragmentação de *habitats*, pesca indiscriminada e poluição. Um trabalho recente trouxe a perspectiva de fazer o transplante de espermatogônias tronco de piracanjuba em lambari (*Astyanax altiparanae*). Após 21 dias do transplante, já foram observados espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos dos lambaris, demonstrando ser uma alternativa potencial na preservação da espécie (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2019).

### **Considerações finais**

O transplante de SSCs tem grande potencial na disseminação de genes desejáveis. Por meio dessa técnica é possível disseminar a genética de

reprodutores de elite para touros de menor valor comercial. Além disso, pode proporcionar uma fonte renovável de células-tronco germinativas em larga escala, permitindo aumentar a disponibilidade de material genético de touros superiores.

Apesar de estudos utilizando a técnica já terem sido realizados em animais de produção como suínos, caprinos e bovinos, ainda existe a necessidade de seu aprimoramento, para que seu potencial possa ser efetivamente difundido como alternativa prática em reprodução assistida.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA pelo apoio a este trabalho.

\*\*\*

### **Bioengineering: spermatogonial stem cells transplantation in mammals**

**Abstract:** Spermatogonial Stem Cell (SSCs) transplantation is a biotechnology that consists in the transfer of testicular stem cells from a fertile donor to a recipient whose endogenous spermatogenesis has been depleted. This technique can be applied to the production of males that generate a progeny with genotypic characteristics of the selected donor. Especially in beef and dairy cattle, SSCs transplantation has the potential to replace artificial insemination (AI). In addition, it has other applications such as restoring fertility in human species after cancer treatment, conserving endangered species and treating specific causes of infertility. Thus, this aim of this review is to discuss the perspectives of reproductive biotechnology that allows the propagation of the genetic material of high pedigree males.

**Keywords:** Biotechnology, Genetics, Reproduction, Spermatogonia, Fertility.

\*\*\*

## Referências

APONTE, P. M. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 4, p. 669-680, 2015. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i4.669>

AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, C. J.; BRINSTER, R. L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. **Nature Medicine**, v. 2, n. 6, p. 693-696, 1996. <https://doi.org/10.1038/nm0696-693>

BRINSTER, C. J. et al. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 412-420, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016519>

BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11303-11307, 1994. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11303>

BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11298-11302, 1994. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11298>

CHAN, F. et al. Functional and molecular features of the Id4+germline stem cell population in mouse testes. **Genes and Development**, v. 28, n. 12, p. 1351-1362, 2014. <https://doi.org/10.1101/gad.240465.114>

CHEN, D.; ABLER D. Demand Growth for Animal Products in the BRIIC Countries. **Agribusiness**, v. 30, n. 1, p. 85-87, 2014. <https://doi.org/10.1002/agr.21368>

CLOUTHIER, D. E. et al. Rat spermatogenesis in mouse testis HHS Public Access. **Nature**, v. 381, n. 6581, p. 418-421, 1996. <https://doi.org/10.1038/381418a0>



DE SIQUEIRA-SILVA, D. H. et al. Preliminary study on testicular germ cell isolation and transplantation in an endangered endemic species *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00631-8>

DOBRINSKI, I. et al. Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 2, p. 142-148, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199906\)53:2<142::AID-MRD3>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<142::AID-MRD3>3.0.CO;2-O)

DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1- 4 SPEC. ISS., p. 137-145, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.020>

EHMCKE, J.; LUETJENS, C. M.; SCHLATT, S. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 293-300, 2005. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.033092>

GIASSETTI, M. I.; CICCARELLI, M.; OATLEY, J. M. Spermatogonial Stem Cell Transplantation: Insights and Outlook for Domestic Animals. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, n. 1, p. 385-401, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115239>

GOTTARDO, P. et al. A strategy to exploit surrogate sire technology in livestock breeding programs. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 1, p. 203-215, 2019. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200890>

GRISWOLD, M. D. Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 1-17, 2016. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>

GRISWOLD, M. D.; MCLEAN, D.; RUSSELL, L. Promise and Limitations of Germ Cell Transplantation in the Testis Minireview. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 713-718, 2001. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02569.x>

HARA, K. et al. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 5, p. 658-672, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.019>

HELSEL, A. R. et al. Id4 levels dictate the stem cell state in mouse spermatogonia. **Development (Cambridge)**, v. 144, n. 4, p. 624-634, 2017. <https://doi.org/10.1242/dev.146928>

HERRID, M. et al. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 617-624, 2006. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01125>

HILL, J. R.; DOBRINSKI, I. Male germ cell transplantation in livestock. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 2, p. 13, 2006. <https://doi.org/10.1071/RD05123>

HONARAMOOZ, A. et al. Germ cell transplantation in goats. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 4, p. 422-428, 2003a. <https://doi.org/10.1002/mrd.10205>

HONARAMOOZ, A. et al. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1260-1264, 2003b. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018788>

HONARAMOOZ, A. et al. Depletion of Endogenous Germ Cells in Male Pigs and Goats in Preparation for Germ Cell Transplantation SANDRA. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 698-705, 2005. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05032>

HONARAMOOZ, A.; MEGEE, S. O.; DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation in pigs. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 21-28, 2002. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.21>

HOWELL, S. J.; SHALET, S. M. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 34, p. 12-17, 2005. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/igi003>

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. **The Anatomical Record**, v. 169, n. 3, p. 533-557, 1971. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690306>

IZADYAR, F. et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. **Reproduction**, v. 126, n. 6, p. 765-774, 2003. <https://doi.org/10.1530/reprod/126.6.765>

IZADYAR, F. et al. Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. **Human Reproduction**, v. 26, n. 6, p. 1296-1306, 2011. <https://doi.org/10.1093/humrep/der026>

JIANG, F. -X; SHORT, R. V. Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. **International Journal of Andrology**, v. 18, n. 6, p. 326-330, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1995.tb00570.x>

JOERG, H. et al. Germ Cell Transplantation in an Azoospermic Klinefelter Bull. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 6, p. 1940-1944, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020297>

JOHNSTON, D. S.; RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. Advances in spermatogonial stem cell transplantation. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 3, p. 183-188, 2000. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050183>

KRAUSZ, C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 2, p. 271-285, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>

LUO J, MEGEE S, RATHI R, D. I. Protein Gene Product 9.5 Is a Spermatogonia-Specific Marker in the Pig Testis: Application to Enrichment and Culture of Porcine Spermatogonia. **Molecular Reproduction & Development**, WILEY-LISS, INC, v. 73, n. 12, p. 1531-1540, 2006. <https://doi.org/10.1002/mrd.20529>

MARVIN L. MEISTRICH, P. D. The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis in Humans. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 5, p. 1180-1186, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.08.010>

MCLEAN, D. J. Spermatogonial stem cell transplantation, testicular function, and restoration of male fertility in mice. **Methods in Molecular Biology**, v. 450, p. 149-162, 2008. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-214-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-214-8_11)

MEISTRICH ML, V. B. M. Spermatogonial stem cells: assessing their survival and ability to produce differentiated cells. (J. J. H. (Editor) Robert E. Chapin (Author), Ed.) MEISTRICH ML, VAN BEEK MEAB, 1993. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-461207-5.50011-0>

MOHAQIQ, M. et al. In vitro transplantation of spermatogonial stem cells isolated from human frozen-thawed testis tissue can induce spermatogenesis under 3-dimensional tissue culture conditions. **Biological research**, v. 52, n. 16, 2019. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0223-x>

MULDER, C. L. et al. Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: A future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 5, p. 561-573, 2016. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw017>

NAGANO, M.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Pattern and Kinetics of Mouse Donor Spermatogonial Stem Cell Colonization in Recipient Testes. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1429-1436, 1999. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1429>

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 197-206, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9252-z>

OATLEY, J. M. Recent advances for spermatogonial stem cell transplantation in livestock. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 1, p. 44-49, 2018. <https://doi.org/10.1071/RD17418>

OGAWA, T. et al. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. **International Journal of Developmental Biology**, v. 41, n. 1, p. 111-122, 1997.

PARK, K. E. et al. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. **Scientific Reports**, v. 7, n. 40176, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep40176>

PARREIRA, G. G. et al. Development of germ cell transplants in mice. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1360-1370, 1998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1360>

RAGNI, G. et al. Sperm banking and rate of assisted reproduction treatment: Insights from a 15-year cryopreservation program for male cancer patients. **Cancer**, v. 97, n. 7, p. 1624-1629, 2003. <https://doi.org/10.1002/cncr.11229>

RIESENBECK, A. Review on International Trade with boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. SUPPL. 2, p. 1-3, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x>

ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of andrology**, v. 21, n. 6, p. 776-798, 2000. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03408.x>

ROOIJ, D. G. The nature and dynamic of spermatogonial stem cells. **Development**, v. 144, n. 17, p. 3022-3030, 2017. <https://doi.org/10.1242/dev.146571>

SAHARE, M. G.; SUYATNO; IMAI, H. Recent advances of in vitro culture systems for spermatogonial stem cells in mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 17, n. 2, p. 134-142, 2018. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12087>

SCHLATT, S. et al. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. **Human Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 144-150, 1999. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.1.144>

SILVA, C. G. et al. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 90-94, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.001>

STOCKWELL, S. et al. Microsatellite detection of donor-derived sperm DNA following germ cell transplantation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 3, p. 462-468, 2009a. <https://doi.org/10.1071/RD08130>

STOCKWELL, S. et al. Microsatellite detection of donor-derived sperm DNA following germ cell transplantation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 3, p. 462-468, 2009b. <https://doi.org/10.1071/RD08130>

SUZUKI, A.; TSUDA, M.; SAGA, Y. Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. **Development**, v. 134, n. 1, p. 77-83, 2007. <https://doi.org/10.1242/dev.02697>

TOMLINSON, M. et al. Review and follow-up of patients using a regional sperm cryopreservation service: Ensuring that resources are targeted to those patients most in need. **Andrology**, v. 3, n. 4, p. 709-716, 2015. <https://doi.org/10.1111/andr.12045>

TSUDA, M. et al. Linked references are available on JSTOR for this article: Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. **Science**, v. 301, n. 5637, p. 1239-1241, 2016. <https://doi.org/10.1126/science.1085222>

UCHIDA, A.; DOBRINSKI, I. The Complete Guide to Male Fertility Preservation. **The Complete Guide to Male Fertility Preservation**, p. 361-375, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42396-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42396-8_20)

VAN PELT, A. M. M. et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A- deficient rat testes. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 439-444, 1996. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.2.439>

YOSHIDA, S. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. **Reproduction**, v. 144, n. 3, p. 293-302, 2012. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0320>

YOSHIDA, S. Open niche regulation of mouse spermatogenic stem cells. **Development, Growth and Differentiation**, v. 60, n. 9, p. 542-552, 2018. <https://doi.org/10.1111/dgd.12574>

ZHENG, Y. et al. Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects. **Reproduction**, v. 147, n. 3, p. R65-R74, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0466>