

## Geração de espermatozoides viáveis após o transplante em animais receptores

*Generation of viable spermatozoa after transplantation into recipient animals*

Naira Caroline Godoy Pieri<sup>1</sup>, Raiane Cristina Fratini de Castro<sup>1,2</sup>, Kaiana Recchia<sup>1,2</sup>, Daniele dos Santos Martins<sup>1</sup>, Fabiana Fernandes Bressan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>1,2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Medicina Veterinária Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13.635-900 Pirassununga, São Paulo, Brasil

### Resumo

Novas tecnologias reprodutivas baseadas em células-tronco germinativas têm sido exploradas em diferentes espécies seja pelas possíveis aplicações na preservação de genótipos e disseminação de material genético, em especial em animais em risco ou de genética desejada, ou mesmo na medicina translacional, como modelos biomédicos. Neste contexto, a manipulação de células germinativas e gametas *in vitro* de machos tem como grandes vantagens a facilidade na manipulação e análise de um grande número de gametas quando comparada à fêmea. Vem-se aprofundando, portanto, o conhecimento sobre anatomia aplicada e fisiologia da espermatogênese, além do estudo do nicho e da obtenção de células germinativas visando sua manipulação em biotecnologias da reprodução em variadas espécies. É, portanto, de grande importância atual a discussão sobre os principais avanços na biotecnologia relacionados às células-tronco espermatogoniais (SSCs) *in vivo* e *in vitro*, além da própria geração de gametas *in vitro*, para restauração da fertilidade, para a conservação de espécies, ou ainda para disseminação de genótipos de interesse. Esta revisão tem o objetivo de fornecer informações atualizadas sobre o progresso alcançado em estudos com células-tronco germinativas masculinas em animais domésticos, seu potencial terapêutico, bem como os modelos de transplante de células espermatogoniais. Ainda, apresenta a geração de células pluripotentes induzidas e seu potencial para a gametogênese *in vitro*, principalmente no contexto de facilitar a geração de animais com alto mérito genético, geneticamente editados ou não, além de possibilitar avanços em pesquisas futuras tanto na medicina veterinária quanto humana.

**Palavras-chave:** Espermatogônias; células-tronco; SSCs.

### Abstract

*New reproductive technologies based on germline stem cells have been explored in different species, whether for their possible applications in the preservation of genotypes and dissemination of genetic material, especially in animals at risk or with desired genetics, or even in translational medicine, as biomedical models. In this context, manipulating germline cells and gametes in vitro from males makes it easier to manipulate and analyze a large number of gametes than from females. Therefore, knowledge about the applied anatomy and physiology of spermatogenesis has deepened, in addition to the study of the niche and the collection of germline cells aimed at their manipulation in reproductive biotechnologies in various species. Therefore, it is of great current importance to discuss the main advances in biotechnology related to spermatogonial stem cells (SSCs) in vivo and in vitro, in addition to the generation of gametes in vitro, for the restoration of fertility, for the conservation of species, or even for the dissemination of genotypes of interest. This review aims to provide updated information on the progress achieved in studies with germline stem cells in domestic animals, their therapeutic potential, and spermatogonial cell transplantation models. Furthermore, it presents the generation of induced pluripotent cells and their potential for in vitro gametogenesis, mainly facilitating the generation of animals with high genetic merit, genetically edited or not, in addition to enabling advances in future research in veterinary and human medicine.*

**Keywords:** Spermatogonia; stem cells; SSCs.

## Introdução

Novas tecnologias reprodutivas, como, por exemplo, o transplante de células germinativas ou mesmo a recente gametogênese *in vitro* (*in vitro gametogenesis*, ou IVG), prometem ser aliadas importantes na otimização reprodutiva em espécies nas quais as tecnologias mais clássicas como a criopreservação de gametas ou a produção de embriões em larga escala ainda não são robustas ou escalonáveis. Neste contexto, a possibilidade de isolar ou gerar células precursoras germinativas, mantê-las *in vitro*, além de expandi-las e criopreservá-las, traz a possibilidade de otimização de uso de gametas funcionais para disseminação de material genético de interesse, ou mesmo de preservar tais genéticas de interesse em biobancos.

Nos machos, as células primordiais germinativas (*primordial germ cells*, ou PGCs) dão origem aos gonócitos e proespermatogônias, e, então, a células especificamente interessantes, que são as células-tronco espermatogoniais (*spermatogonial stem cells*, ou SSCs). As SSCs são as células-tronco do testículo adulto responsáveis por promover a manutenção do processo de espermatogênese por meio de sua autorrenovação, ou, eventualmente, se diferenciam para produzir gametas viáveis. São células raras, porém, passíveis de serem isoladas, caracterizadas e mantidas *in vitro*. Desta maneira, em um sistema de cultura *in vitro*, as SSCs podem ser induzidas a se diferenciar em células germinativas masculinas mais diferenciadas, representando uma ferramenta interessante para diferentes aplicações reprodutivas (APONTE; APONTE; PROMETEO, 2015; XI et al., 2021).

O aprimoramento da biotecnologia reprodutiva com o uso de SSCs tem sido discutido em diversas espécies animais, e em especial em animais domésticos de grande porte, uma vez que o desenvolvimento da linhagem de SSCs *in vitro* pode ser bastante benéfica para a geração de animais geneticamente editados para características desejadas à produção e reprodução animal. Assim, as SSCs, por serem células adultas do macho que se dividem mitoticamente e contribuem diretamente com material genético para a próxima geração, são consideradas alvos ideais para manipulação genética, além de possibilitar a identificação de genes associados a doenças fenotípicas, bem com aplicações em tratamentos veterinários e humanos relacionados à fertilidade e transplantes (APONTE; APONTE; PROMETEO, 2015; HARKEY et al., 2013; OATLEY; BRINSTER, 2006; TRAVIS; KIM; MEYERS-WALLEN, 2009).

Há mais de três décadas foi reportado pela primeira vez o transplante homólogo de SSCs em camundongos, mostrando que essas células têm a capacidade de colonizar os túbulos seminíferos após o transplante, e assim restaurar a espermatogênese (BRINSTER; AVARBOCK, 1994). Desde então, a técnica vem sendo aprimorada e usada de maneira homóloga ou xenogênica em espécies diversas, com considerável desenvolvimento após os anos 2000, como por exemplo em roedores, primatas não humanos, (HERMANN et al., 2012; OGAWA et al., 2000), porém, com menor robustez e eficiência em animais domésticos, sendo que diversos protocolos que compõem a técnica, como, por exemplo, o cultivo *in vitro* das SSCs a longo prazo, e o preparo dos animais receptores com a ablação das células germinativas endógenas, ainda carecem de estudos mais profundos e reproduzíveis em larga escala (NAKAMI et al., 2021).

Grande parte das pesquisas em isolamento, caracterização e transplantes iniciais de SSCs em animais além de roedores e primatas têm foco não somente na biologia reprodutiva e em mecanismos de desenvolvimento e função das células-tronco germinativas, mas também, em especial, a possibilidade de restauração da fertilidade, assim como a preservação de espécies ameaçadas. Especificamente no campo da pecuária, a geração de gametas “*ex vivo*” do doador inicial deverá ser uma importante ferramenta reprodutiva e de melhoramento genético para as próximas gerações na produção animal. Esta revisão descreve e discute, portanto, um breve histórico sobre isolamento e caracterização das SSCs, seu potencial uso em transplantes visando a geração de gametas viáveis de interesse, e, além disso, prospecta os mais recentes avanços da biologia reprodutiva com novas tecnologias de reprogramação celular e geração de células que poderão ser utilizadas para as mais diversas aplicações, desde modelos pré-clínicos, em terapia reprodutiva e medicina humana e veterinária para a preservação da fertilidade e restabelecimento da espermatogênese, ou uso em aplicações para conservação e disseminação do material genético.

### *Caracterização molecular das células tronco espermatogoniais (SSCs)*

A caracterização molecular das SSCs é um ponto fundamental para a identificação, separação ou isolamento e uso adequado das SSCs. Até o momento, um perfil mais completo foi identificado em camundongos. Nestes, antígenos específicos de marcadores de superfície envolvidos na regulação da autorrenovação e na manutenção das SSCs já foram reportados, como, por exemplo, do GDNF *Family Receptor Alpha 1* (GFRA-1) (BUAGEAW et al., 2005) e o ZFP145, que codifica o repressor transcricional PLZF (COSTOYA et al., 2004), integrina alfa-6 (CD49f), e negativas para receptor de tirosina quinase (c-

KIT ou CD117) (KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2003; SHINOHARA; AVARBOCK; BRINSTER, 1999). Ainda, o THY1 (CD90) é comumente utilizado como um marcador de SSC, sendo que este foi encontrado na maioria das células germinativas de animais pré-púberes e não nas diferenciadas (SONG et al., 2024).

Em animais domésticos, o conhecimento sobre marcadores fenotípicos de espermatogônias ainda é relativamente limitado, porém, diversos estudos já demonstraram certa similaridade na caracterização de SSCs e outros tipos de espermatogônias indiferenciadas entre as espécies, sendo alguns dos estudos sumarizados aqui (Tabela 1). Por exemplo, em bovinos já foram reportados PLZF, dolichos biflorus agglutinin (DBA), protein gene product 9.5 (PGP 9.5), THY1 e GFRA-1 (APONTE et al., 2006; GIASSETTI et al., 2016). Nesta espécie o GFRA-1 demonstrou ser um marcador de superfície confiável para a caracterização de células germinativas indiferenciadas em testículos de animais pré-púberes (KIM et al., 2019), assim como o THY1(CD90), que é utilizado para isolar as SSCs, em conjunto com outros, por ser um marcador de superfície (REDING et al., 2010a). A presença de GFRA-1 e PLZF em células germinativas esféricas de bovinos corrobora com os achados de níveis mais altos de mRNAs destes, quando comparados a genes de pluripotência OCT4 (*octamer binding transcription factor 4*), SOX2 (*SRY-box transcription factor 2*) e NANOG (*Nanog Homeobox*), utilizando-os como marcadores conservados de células-tronco da linha germinativa masculina indiferenciada (CAI et al., 2016b). O PLZF, em touros, é supostamente expresso na subpopulação de espermatogônias tipo A e pode ser utilizado como um marcador de espermatogônias indiferenciadas. Ainda, foi relatado que a densidade de PLZF em espermatogônias indiferenciadas não difere entre testículos de touros jovens e idosos (KAWAHARA et al., 2021; REDING et al., 2010b).

Em suínos, foram reportados como marcadores em SSCs PLZF, PGP9.5/UCHL1 (*Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1*), GFRA-1 (BINSILA et al., 2021; GOEL et al., 2007). Quando realizado o *knockdown* do PLZF em espermatogônias imaturas, houve a diminuição de expressão de genes relacionados à autorrenovação espermatogonial e regulação positiva de genes de diferenciação (CUI et al., 2025). Ainda, a proteína DAZL (*deleted in azoospermia-like*) já foi descrita como necessária para garantir a sobrevivência das células da linha germinativa nesta espécie (NICHOLLS et al., 2019).

Recentemente, nosso grupo demonstrou a detecção de proteínas no testículo de suínos de diferentes idades (desenvolvimento embrionários, pré-púberes e adulto). Nos animais pré-púberes, as espermatogônias foram positivas para PLZF, STRA8 (*stimulated by retinoic acid 8*), VASA/DDX4 (*dead-box RNA helicase Vasa*) e STELLA/DPPA3 (*developmental pluripotency-associated protein 3*). Já nos animais adultos, espermatogônias indiferenciadas raras, localizadas próximas à membrana basal, foram positivas para PLZF e OCT4. Espermatogônias diferenciadas e os espermátócitos primários foram positivos para VASA. Ainda, DAZL e STRA8 foram detectados em espermatogônias diferenciadas próximas à membrana basal dos túbulos e em espermátócitos primários (JORGE et al., 2023). Outro estudo relatou um novo marcador para espermatogônias diferenciadas, a proteína PODXL2 (*Podocalyxin like 2*), uma vez que as células positivas para PODXL2 também são positivas para c-KIT, que é uma proteína encontrada em espermatogônias diferenciadas (ZHANG et al., 2021).

O estudo das SSCs em pequenos animais domésticos é promissor tanto para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, especialmente para a preservação de espécies ameaçadas, no caso dos felinos, como para modelos biomédicos de restauração de infertilidades, nos cães. Em gatos, SSCs já foram isoladas e mantidas brevemente *in vitro*. Assim como nas outras espécies, muitos marcadores considerados conservados foram encontrados, como THY1, GFRA, PLZF, e OCT4, tanto no testículo inteiro quanto em população enriquecidas (VANSANDT; PUKAZHENTHI; KEEFER, 2012). Portanto, é imprescindível que a identificação mais específica das SSCs seja feita utilizando sempre marcações conjuntas, como, por exemplo, pela coexpressão de GFRA-1 e DDX-4 (TIPTANAVATTANA et al., 2013). Em cães, mais estudos são reportados. Pieri e colaboradores demonstraram, “*in situ*”, a presença de GFRA-1 e PLZF em espermatogônias de cães adultos e pré-púberes, sendo detectado um maior número de células positivas nos túbulos seminíferos dos animais pré-púberes. A DAZL foi detectada na membrana/citoplasma em espermatogônias do tipo A e intermediárias em testículos pré-púberes, também foi relatada em adultos principalmente em células localizadas no centro dos túbulos seminíferos, indicando sua presença em espermatogônias diferenciadas. Após o isolamento destas células, pode ser identificada uma população de células germinativas não aderentes que expressava os marcadores PLZF, GFRA-1 e STRA8, sugerindo que essas células poderiam se autorrenovar *in vitro*. Além disso, foi detectado um número de células positivas, por citometria de fluxo para as proteínas OCT4, c-KIT e DAZL, que são importantes durante o processo espermatogênico (PIERI et al., 2016, p. 20). Outros marcadores como PGP9.5, OCT4, NANOG, SCP3 (*synaptonemal complex protein 3*), dentre outros, também foram encontrados em células germinativas

caninas em estudos com cães, muitas vezes mostrando diferenças na detecção desses marcadores nos testículos de cães adultos e jovens (HARKEY et al., 2013; LEE et al., 2014, 2017).

Com o aumento de estudos nesta área, novos marcadores vêm sendo reportados. Foi descrito um novo marcador de SSC funcional associado à membrana celular, o MC2R (*melanocortin 2 receptor*), um receptor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cuja alta expressão foi identificada em células positivas para o THY1 (ABUMADIGHAM et al., 2025). Também, a expressão positiva da proteína reguladora de sinal alfa (SIRPA) em espermatogônias indiferenciadas, por exemplo, foi reportada em camundongos, ratos e primatas não humanos, além da sua expressão positiva em SSCs após transplante xenogênico, sugerindo que esta proteína é um marcador conservado de SSCs, responsável por promover divisão e autorrenovação dessas células (MIYAZAKI et al., 2023). Esses estudos, descritos na tabela 1, contribuem para a identificação de proteínas específicas em diferentes estágios das células germinativas caninas, bem como a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na espermatogênese.

### ***Cultivo e manutenção in vitro de SSCs de animais domésticos***

É descrito que apenas 0,03% das células germinativas são SSCs em camundongos, tornando este número ainda extensivamente menor quando comparado ao total de células em um órgão, e, ainda, tal quantidade pode variar dependendo de fatores como idade, saúde e manipulações experimentais (OATLEY; RACICOT; OATLEY, 2011; TAGELENBOSCH; DE ROOIJ, 1993). O acesso a um número suficiente de SSCs é um pré-requisito para aplicações e estudos posteriores como edição genética e o transplante, portanto, o isolamento e enriquecimento destas células, enquanto mantidas *in vitro*, são altamente desejáveis, ainda que desafiadores. As SSCs necessitam de um microambiente adequado, ou nicho, para sobreviver. Sistemas de cultivo suplementados com a utilização de meios ou fatores de crescimento específicos, ou meio condicionado originado de testículo e monocamada alimentadora vêm sendo testados, com o objetivo de expandir efetivamente as SSCs e manter seu estado indiferenciado *in vitro*.

Nos últimos anos, alguns progressos no isolamento, purificação e manipulação genética de SSCs de animais domésticos foram relatados, embora o modelo mais estudado ainda seja o camundongo, e, portanto, as condições para o cultivo *in vitro* de SSCs descritas para camundongos tornaram-se a base para o desenvolvimento de sistemas de cultivo em outras espécies. Nos camundongos, as SSCs *in vitro* apresentam um crescimento exponencial por anos sem perder seu estado indiferenciado. Observou-se que o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), muitas vezes associado ao bFGF, promove a proliferação contínua de linhagens de SSCs de camundongo, que formaram aglomerados celulares positivos para OCT4 e são capazes de restabelecer a espermatogênese e fertilidade após transplante (KANATSU-SHINOHARA et al., 2005; KUBOTA; AVARBOCK; BRINSTER, 2004).

As SSCs que se autorrenovam, proliferam e expandem *in vitro* são chamadas de células-tronco germinativas (*germ-line stem cells*, ou GSCs). Há relatos de colônias ou linhagens que surgem espontaneamente em cultura a partir da população de SSCs, apresentando propriedades pluripotentes, e em alguns estudos foram chamadas de células-tronco germinativas multipotentes (mGSCs) (KANATSU-SHINOHARA; TAKEHASHI; SHINOHARA, 2008).

Entretanto, já se sabe que esse sistema de cultivo nem sempre é adequado ou suficiente para sustentar as SSCs de outras espécies por longos períodos, como, por exemplo, em suínos, embora alguns testes já tenham sido realizados ao longo dos anos, como por exemplo com o uso de plaqueamento diferencial, diferentes fatores de crescimento (ex., GDNF, FGF2, LIF, IGF1) e cultivo dessas células sobre monocamadas de células de Sertoli inativadas, tendo sido mantidas por períodos como alguns meses ou menos de 10 passagens (KUIJK; COLENBRANDER; ROELEN, 2009; ZHANG et al., 2017), muitas vezes visando sua diferenciação em gametas ou estágios pós-meióticos (YOU et al., 2023; ZHAO et al., 2022). Em 2017, foi demonstrado que as SSCs mantidas em um microambiente de cultura 3D conseguem se autorrenovar e se manter por mais tempo *in vitro*, do que quando cultivadas em cultura 2D. Os autores analisaram a formação de colônias celulares, morfologia, atividade da fosfatase alcalina, transcrição e regulação translacional de genes relacionados à autorrenovação, viabilidade celular, entre outros parâmetros (PARK et al., 2017a).

Da mesma forma que em suínos, em bovinos, vários fatores como a temperatura, fatores de crescimento, substrato de matriz celular, camada alimentadora e sistemas com e sem soro foram testados (APONTE et al., 2006, 2008; CAI et al., 2016a, 2016b; GIASSETTI; CICCARELLI; OATLEY, 2019; IZADYAR, 2002; KIM et al., 2014b; LU et al., 2012; OATLEY; REEVES; MCLEAN, 2004; SAHARE et al., 2014, 2016; SUYATNO et al., 2018), incluindo o estabelecimento de um cultivo a longo prazo, quando SSCs foram cultivadas com a suplementação de fatores de crescimento que incluíssem GDNF, FGF2 e LIF, em meio condicionado, com ou sem monocamada de fibroblastos inativados (OATLEY et al., 2016).

Em cães, o isolamento, enriquecimento e cultivo de SSCs realizados a partir de animais entre 2 e 12 meses de idade foram reportados, em diferentes condições, e com relativo sucesso na diferenciação, no transplante xenogênico, e também na criopreservação (HARKEY et al., 2013; LEE et al., 2014, 2016). Pieri e colaboradores, em 2016, descreveram o protocolo de isolamento, cultura e caracterização de SSCs caninas provenientes de cães de 3-6 meses de idade. As células germinativas cultivadas não apresentaram aderência à placa, mas assim como descrito por outros autores, apresentavam formato redondo e, após 5 dias, formavam aglomerados sobre uma camada de células. Os autores combinaram 2 técnicas de enriquecimento o plaqueamento diferencial e o gradiente de densidade de *Percoll*, demonstrando a eficiência de purificação e isolamento de SSCs caninas (PIERI et al., 2016), e testaram a eficiência destas células realizando um transplante xenogênico (PIERI et al., 2019a). Poucos são os estudos que consolidam uma forma de cultura de SSCs em animais domésticos, portanto, novas investigações devem ser realizadas, em especial sobre o nicho *in vitro* no qual essas células são mantidas e sua influência sobre o comportamento delas após o transplante.

### Geração de gametas masculinos *ex situ*, *in vivo*: transplante de SSCs e xenoenxerto

O transplante de SSCs (*spermatogonial stem cell transplant*, ou SSCT), como já mencionado, foi realizado pela primeira vez em camundongos já há três décadas (BRINSTER; AVARBOCK, 1994; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994). A técnica consiste resumidamente em isolar as células coletadas de testículos de animais jovens ou adultos, caracterizá-las, e então transplantá-las mediante injeção no túbulo seminífero do animal receptor, geralmente propositalmente infértil, para que a colonização das células do animal doador colonizem o nicho testicular do receptor. Então, após algumas semana ou meses (a depender da espécie), espera-se que as SSCs reiniciem a espermatogênese, produzindo espermatozoides do animal doador no animal receptor. Portanto, por meio do acasalamento natural, inseminação artificial ou outras técnicas como fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) estes receptores conseguem gerar nova prole. No caso das células transplantadas serem geneticamente editadas, a nova geração conteria a informação. Com estes resultados, novas possibilidades para o uso de SSCs surgiram, por exemplo, na biomedicina e na agricultura, para a produção de animais geneticamente modificados, e para a conservação e disseminação de material genético.

Estudos xenogênicos com células germinativas de diversas espécies doadoras foram realizados com sucesso mostrando colonização e em alguns casos a restauração da espermatogênese após o transplante nos testículos de camundongos receptores (Figura 1). Entre elas, hamsters (OGAWA et al., 1999), coelhos e cães (DOBRINSKI; AVARBOCK; BRINSTER, 1999; PIERI et al., 2019a), primatas (NAGANO; MCCARREY; BRINSTER, 2001), bovinos (OATLEY; REEVES; MCLEAN, 2004), e gatos (HONARAMOOZ et al., 2003) (Figura 2). Em relação ao transplante autólogo ou heterólogo, que possibilita a geração da progênie propriamente dita, grandes avanços recentes também foram reportados quanto à habilidade de SSCs transplantadas restaurarem a espermatogênese em animais receptores, por exemplo, em bovinos (IZADYAR et al., 2003; STOCKWELL et al., 2009), suínos (HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002; KIM et al., 2014a), porém ainda sem sucesso em outras espécies como equinos (JUNG; YOON, 2021).

Já a geração de embriões ou progênie nascida a partir do animal doador onde as SSCs foram transplantadas para um animal receptor de mesma espécie também já foi reportada, sendo a maioria usando marcações após edição genética ou com o uso de microssatélites, porém, com relativa ineficiência. São exemplos de embriões produzidos ou animais nascidos de SSCT as espécies suína (KIM et al., 2014a; ZENG et al., 2013), caprina (HONARAMOOZ et al., 2003, 2008), ovinos (HERRID et al., 2009b), musaranhos (LI et al., 2017), e primatas não humanos (HERMANN et al., 2012). Em suínos, Zeng e colaboradores mostraram a presença de espermatozoides dos doadores nos ejaculados dos animais receptores, após 9 a 11 meses de transplante. Ainda, demonstraram que alguns javalis, 5 anos após o transplante, ainda apresentavam espermatozoides dos doadores, os quais foram coletados para a geração embriões transgênicos. Em outro estudo, foi realizado o transplante de SSCs positivas para a proteína fluorescente verde (GFP) em suínos de 12 a 14 semanas de idade, nascidos de fêmea tratadas com o quimioterápico bussulfano. Segundo os autores, os animais produziram espermatozoides GFP positivos, viáveis, capazes de gerar um novo embrião GFP mediante ICSI (KIM et al., 2014a; ZENG et al., 2013). Em cabras, foi reportado o sucesso do transplante de células testiculares provenientes de animais geneticamente modificados em animais receptores que tiveram os testículos irradiados. O sêmen do animal doador coletado no animal receptor foi utilizado para a geração de uma nova prole por FIV e por monta natural (HONARAMOOZ et al., 2003, 2008). No cão, apesar de poucos estudos, foi demonstrado o xenotransplante de tecidos de cães sexualmente maduros em camundongos imunossuprimidos, ou em cães

irradiados, indicando a possibilidade da espermatogênese completa, apesar de não ainda eficiente (DOBRINSKI; AVARBOCK; BRINSTER, 1999; HARKEY et al., 2013; KIM et al., 2008). Pieri e colaboradores realizaram o xenotransplante de SSCs de cães pré-púberes em camundongos tratados com bussulfano. As SSCs foram isoladas e mantidas em meio com FSH, que está integrado à via de autorrenovação das SSCs mediada por GDNF. Após o transplante, as células se mantiveram nos túbulos seminíferos, porém, não foi observada a restauração da espermatogênese (PIERI et al., 2019a).

A técnica de transplante é realizada em 4 etapas. A primeira etapa envolve a preparação do testículo receptor, a fim de torná-lo infértil; a segunda etapa consiste no isolamento das espermatogônias do doador e na manutenção dessas células em um sistema de cultivo composto, geralmente com uma monocamada de células inativadas (MEFs ou Sertoli), suplementado com diferentes citocinas, dependendo da espécie. Nesta fase, as células podem ser geneticamente editadas ou não. Em seguida, na terceira etapa, é realizado o transplante das células do doador, que geralmente apresentam alto nível de células tronco espermatogoniais endógenas; e, portanto, geralmente são submetidos a algum tratamento de ablação dessas (quimioterápico, irradiação ou edição gênica); e, na quarta e última etapa, é realizada a verificação do material genético obtido do ejaculado do receptor, como viabilidade e origem genética (TRAVIS; KIM; MEYERS-WALLEN, 2009). Até o momento, os animais que produziram espermatozoides viáveis após SSCT foram capazes de gerar embriões ou descendentes mediante produção *in vitro* de embriões como a ICSI.

A identificação de SSCs presentes na suspensão celular antes do transplante representa um dos pontos mais críticos para a obtenção bem-sucedida de colônias de SSCs no testículo do receptor. Considerando a pequena quantidade de SSCs no testículo doador, e a necessidade de colocação de marcadores como discutido previamente, a identificação de SSCs, e, conseqüentemente, sua purificação e expansão ainda carecem de otimizações. São dois os principais métodos de identificação e purificação, sendo um deles mediante marcação específica por fluorescência e separação (*fluorescence-activated cell sorting*, ou FACS), ou a separação de células ativadas magneticamente (*magnetic cell separation technology*, ou MACS), e o segundo método é composto por meios físicos, como o plaqueamento diferencial, a seleção da matriz extracelular e a sedimentação em gradiente de densidade (APONTE, 2015; ZHENG et al., 2014), sendo os primeiros considerados mais específicos.

No processo de transplante, a preparação do animal receptor para que este se torne infértil é uma das etapas mais desafiadoras. Atualmente existem algumas técnicas utilizadas, entre elas o tratamento com quimioterápicos, como o bussulfano (BRINSTER; AVARBOCK, 1994; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994; OGAWA et al., 1997), por irradiação (CREEMERS et al., 2002), choque térmico (MA et al., 2018, 2011), ou a utilização de animais inférteis gerados a partir de deleção de genes importantes para a gametogênese (CICCARELLI et al., 2020; LARA et al., 2023). Estas ferramentas são empregadas comumente em camundongos, já em animais de grande porte ou outras espécies, adversidades como encontrar a dose adequada de quimioterápicos para não causar efeitos adversos importantes, que restringem o transplante efetivo das SSCs (BISHOP; WASSOM, 1986). A irradiação, da mesma forma que o bussulfano, apresenta efeitos variados dependendo da espécie, idade do animal e dose aplicada de irradiação (HERRID et al., 2009a). Além disso, pode danificar as células de Sertoli e a estrutura dos túbulos seminíferos, podendo causar esterilidade permanente.

Em animais de grande porte, atualmente, a tecnologia de edição gênica para animais receptores é provavelmente a mais promissora para o transplante de SSCs (GIASSETTI; CICCARELLI; OATLEY, 2019), apesar destes implicarem, geralmente, em usos específicos e não como disseminadores da genética recebida, principalmente por demandarem instalações especializadas e alto custo. Alguns estudos, realizados primeiro em camundongos (TSUDA et al., 2003) e, mais recentemente, em outras espécies como suínos, caprinos e bovinos (CICCARELLI et al., 2020; FAN et al., 2019; PARK et al., 2017b), têm gerado animais *knockout* de genes específico de PGCs essenciais para o desenvolvimento de células germinativas fetais ou para a espermatogênese. A intenção é alcançar a perda completa da espermatogênese, porém mantendo as células de Sertoli e a produção de testosterona. O *knockout* de NANOS2, NANOS3 ou de DAZL em suínos são exemplos recentes (KOGASAKA et al., 2022; LARA et al., 2023; PARK et al., 2017b).

Mesmo com o sucesso da restauração da espermatogênese em camundongos, com a geração de uma nova prole, o cultivo das SSCs e a manutenção a longo prazo *in vitro* sempre foram grandes desafios. O critério mais rigoroso das funções do SSC é a restauração da fertilidade, no entanto, poucos estudos abordaram questões básicas associadas à restauração da fertilidade, possivelmente devido às dificuldades e ineficiência da técnica de transplante de espermatogônias. Diversos estudos que mostraram a espermatogênese completa nesta e em outras espécies, não chegaram a reportar prole saudável, ou que as SSCs sejam funcionalmente normais.

Uma técnica alternativa ao transplante celular é o xenoenxerto, que consiste na implantação de pequenos fragmentos de tecido testicular, fresco ou após criopreservação, no tecido subcutâneo do animal. O xenoenxerto viabiliza a manutenção e a propagação das células germinativas, o que pode facilitar sua aplicação em diferentes espécies de mamíferos (ABBASI; HONARAMOOZ, 2011; FAYOMI et al., 2019; HAYAMA et al., 2014; HONARAMOOZ et al., 2002a; KANEKO et al., 2013). Nesta técnica, os camundongos são utilizados como animais receptores e devem ser imunossuprimidos para evitar a rejeição do tecido. O enxerto é implantado abaixo da pele do camundongo, onde formará uma conexão circulatória funcional entre o receptor e o enxerto. Essa interação possibilita o estabelecimento de mecanismo de resposta entre as células da hipófise e células endócrinas do tecido enxertado. Após semanas ou meses, o enxerto começa a crescer e a iniciar a espermatogênese, produzindo espermatozoides (APONTE; APONTE; PROMETEO, 2015; ARREGUI; DOBRINSKI, 2014; LEE et al., 2016; TRAVIS; KIM; MEYERS-WALLEN, 2009).

A primeira vez que o procedimento foi realizado com sucesso foi em camundongos há mais de 20 anos (HONARAMOOZ et al., 2002b; SCHLATT et al., 2003). Assim como o xenotransplante, o xenoenxerto foi reportado em espécies diversas (primatas, roedores, lagomorfo, carnívoros, animais de produção) que foram utilizadas como doadoras de tecido testicular, sendo que muitas apresentaram espermatogênese completa (ARREGUI; DOBRINSKI, 2014) (ABRISHAMI et al., 2010; ARREGUI et al., 2008; HONARAMOOZ et al., 2002a; OATLEY et al., 2004; RATHI et al., 2005, 2006; RATHI; MEGEE; HONARAMOOZ, 2008; SCHLATT et al., 2006; SNEDAKER; HONARAMOOZ; DOBRINSKI, 2004). Em suínos, o xenoenxerto de fragmentos do tecido testicular foi realizado, e foi observada a restauração da espermatogênese após 180 dias, com a produção de espermatozoides funcionais, capazes de gerar novos indivíduos via ICSI (KANEKO et al., 2013).

Limitações desta técnica incluem, mas não se limitam, a diferenças entre espécies quanto à temperatura ou rejeição, falta de vascularização, resultados ainda inconsistentes, e, certamente, questionamentos quanto à viabilidade de sua aplicação em larga escala seja, para produção de novos animais ou pela implicação ética na geração de espermatozoides humanos viáveis (GOOSSENS; VAN SAEN; TOURNAYE, 2013).

#### **Geração de gametas masculinos “ex situ”, “in vitro”: gametogênese *in vitro* usando células de pluripotência induzida (células iPSCs)**

O transplante de SSCs, assim como o xenoenxerto, são técnicas promissoras e interessantes para o desenvolvimento de novas oportunidades e aplicações terapêuticas e reprodutivas. Porém, como previamente descrito, ainda enfrentam algumas limitações técnicas (por ex. uma maior padronização da caracterização e maior facilidade de isolamento e expansão), biológicas (como necessidade de receptores inférteis ou então, no caso terapêutico, imunossuprimido), e, em especial no caso da possibilidade de uso em humanos ou em animais para restaurar sua própria fertilidade, aspectos éticos, de segurança, além da limitação de não reverter um quadro de depleção de células gonadais do próprio paciente ou organismo. O SSCT, apesar de bem descrito em camundongos, e de relatos mais recentes em outras espécies, com estudos em universidades e institutos agropecuários que visam otimizar protocolos e viabilizar a técnica, ainda não apresenta uma robusta aplicação em larga escala.

Neste sentido, células-tronco de pluripotência induzida (*induced pluripotent stem cells*, ou iPSCs), que são obtidas a partir de um organismo adulto, são consideradas o novo “fator transformador” na medicina translacional e reprodutiva. A geração de iPSCs consiste na expressão forçada de fatores de transcrição específicos relacionados à pluripotência que permitem sua reprogramação a um estado indiferenciado, e, então, na diferenciação em diversos tipos celulares *in vitro*. Podem ser usados diferentes fatores ou metodologias, sendo o conjunto de fatores mais conhecido, o OSKM (OCT3/4, fator de transcrição SRY-Box 2 ou SOX2, c-MYC e fator *Kruppel-like 4* ou KLF4). Tal feito já foi bem demonstrado em humanos e camundongos, e vem sendo também elucidada em espécies domésticas e selvagens, o que abre novas possibilidades na medicina regenerativa e na ciência reprodutiva (PESSÔA; BRESSAN; FREUDE, 2019; PIERI et al., 2019b).

O desenvolvimento de iPSCs permitiu que pesquisadores superassem barreiras importantes relacionadas ao trabalho com células tronco embrionárias (CTEs), como, por exemplo, possibilitando o desenvolvimento de terapias autólogas sem o uso de embriões. A aquisição de iPSCs foi relatada em diferentes espécies além de humanos e camundongos, como em diferentes animais domésticos (animais de estimação e de fazenda) e selvagens, como revisado por Pessôa et al., 2009 (PESSÔA; BRESSAN; FREUDE, 2019).

Especificamente quanto às tecnologias reprodutivas, as iPSCs de espécies domésticas ou selvagens pode contribuir significativamente oferecendo oportunidades sem precedentes para restaurar a fertilidade,

preservar espécies ameaçadas de extinção e gerar animais transgênicos para aplicações biomédicas. De maneira importante e revolucionária, as iPSCs já foram diferenciadas em células germinativas primordiais (células semelhantes a PGCs, *primordial germ cell like cells*, ou PGCLCs) e gametas funcionais em camundongos (HAYASHI et al., 2011, 2012, p. 201), chegando a reconstituir todo o ciclo da oogênese e foliculogênese na fêmea, e a espermatogênese em machos, ou seja, possibilitou a gametogênese *in vitro* em animais (HIKABE et al., 2016; ISHIKURA et al., 2021; YAMASHIRO et al., 2020).

Nosso grupo de pesquisa relatou resultados preliminares sobre a geração de PGCLCs suínas a partir de iPSCs (PIERI et al., 2022) e também de iPSCs bovinas (BRESSAN et al., 2018). Estas últimas foram analisadas quanto ao seu perfil de pluripotência, marcadores epigenéticos, dinâmica de *imprinting* genômico, perfil de miRNA e análise global de transcritos. Recentemente, Murase e colaboradores (2024) induziram a reprogramação epigenética e a diferenciação de células-tronco pluripotentes de PGCLCs humanas em pró-espermatogônias ou oogônias mitóticas. Eles demonstraram que a sinalização de BMP é um fator-chave na diferenciação de hPGCLCs (MURASE et al., 2024).

A literatura recente mostra a geração de novos descendentes e indivíduos férteis a partir da diferenciação de iPSCs em PGCLCs em roedores (HIKABE et al., 2016; OIKAWA et al., 2022). Especificamente em machos, Ishikura e colaboradores (2021) foram capazes de reconstituir com sucesso todo o desenvolvimento de células germinativas masculinas *in vitro* a partir de iPSCs, em camundongos (ISHIKURA et al., 2021). Neste estudo, células pluripotentes foram induzidas a PGCLCs e cocultivadas em testículos reconstituídos, *in vitro*, sob condições otimizadas. Nestas condições, as PGCLCs diferenciam-se em células semelhantes a espermatogônias, com perfil de desenvolvimento e expressão gênica similar às PGCs *in vivo*. Ainda, foram capazes de expandir como células semelhantes a células-tronco germinativas (GSLCs), e apresentaram espermatogênese adequada, não apenas após o transplante para testículos *in vivo*, mas também em cultura *in vitro* de transplantes de testículos, sendo que as espermátides geradas contribuíram para o nascimento de prole (ISHIKURA et al., 2021).

Por fim, o principal objetivo da gametogênese *in vitro* é superar a infertilidade, seja por causas genéticas ou adquiridas, mas também permite diversas outras aplicações como o aumento da quantidade de gametas para estudos básicos ou aplicados. Neste contexto, não somente as SSCs teriam a capacidade de transferir seu material genético para outras gerações após transplante ou xenoenxerto, mas também, como nova alternativa, células germinativas e até mesmo gametas funcionais já podem ser gerados em laboratório quando utilizadas as iPSCs. Em animais domésticos e silvestres, a IVG a partir de iPSCs tem grande aplicabilidade na busca da compreensão dos processos de aquisição de totipotência e, conseqüentemente, aumentar a produção *in vitro* de gametas e embriões, além de se destacar por possibilitar a correção de distúrbios reprodutivos, e melhorar a produção e a reprodução animal, especialmente em bovinos e suínos, que estão entre as espécies de gado mais importantes para a produção de leite e carne. Além disso, essa tecnologia poderia potencialmente permitir a preservação de animais ameaçados de extinção ou mesmo a geração de novos indivíduos a partir de animais não convencionais ou mesmo extintos, desde que existam células viáveis.

### Considerações finais

A discussão sobre os principais avanços na biotecnologia relacionados às células-tronco espermatogoniais (SSCs) *in vivo* e *in vitro*, além da própria geração de gametas *in vitro*, para restauração da fertilidade, para a conservação de espécies, ou ainda para disseminação de genótipos de interesse, são abordagens promissoras na medicina reprodutiva, tanto humana quanto veterinária.

Especificamente quanto às SSCs, e seu transplante entre animais, o sucesso depende de vários fatores como a caracterização fenotípica das células transplantadas, estabelecimento de protocolos de cultura, manutenção, e as condições para obtenção de um animal receptor adequado para cada objetivo. Apesar de bem descrita em camundongos, a tecnologia de SSCT ainda esbarra em alguns entraves éticos ou técnicos, tanto para seu uso em medicina regenerativa humana ou para biotecnologias reprodutivas em animais domésticos e silvestres. Desta forma, novas tecnologias como a geração de células germinativas, aqui focadas nas células tronco pluripotentes induzidas, permitem abrir um leque de possibilidades como alternativas à disseminação ou conservação de material genético, ou mesmo para superação de infertilidades genéticas ou adquiridas.

### Referências

ABBASI, S.; HONARAMOOZ, A. Xenografting of testis tissue from bison calf donors into recipient mice as a strategy for salvaging genetic material. *Theriogenology*, v. 76, n. 4, p. 607–14, 1 set. 2011.

- ABRISHAMI, M. et al.** Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology*, v. 73, n. 1, p. 86–96, 2010.
- ABUMADIGHEM, A. et al.** Adrenocorticotrophic hormone and its receptor as a novel testicular system involves in the development of spermatogenesis. *Life sciences*, v. 368, 1 maio 2025.
- APONTE, P. M. et al.** Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology*, v. 65, n. 9, p. 1828–1847, jun. 2006.
- APONTE, P. M. et al.** Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 136, n. 5, p. 543–57, nov. 2008.
- 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, 26 maio 2015.
- APONTE, P. M.; APONTE, P. M.; PROMETEO, A. P.** Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, v. 7, n. 4, p. 669, 2015.
- ARREGUI, L. et al.** Xenografting of adult mammalian testis tissue. *Animal Reproduction Science*, 2008.
- ARREGUI, L.; DOBRINSKI, I.** Xenografting of testicular tissue pieces: twelve years of an in vivo spermatogenesis system. *Reproduction*, v. 148, n. 5, p. R71-84, 2014.
- BINSILA, B. et al.** Current scenario and challenges ahead in application of spermatogonial stem cell technology in livestock. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 38, n. 12, p. 3155–3173, 1 dez. 2021.
- BISHOP, J. B.; WASSOM, J. S.** Toxicological review of busulfan (Myleran). *Mutation research*, v. 168, n. 1, p. 15–45, jul. 1986.
- 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. 11303–7, 22 nov. 1994.
- 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. 11298–302, 22 nov. 1994.
- BUAGEAW, A. et al.** GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biology of reproduction*, v. 73, n. 5, p. 1011–6, nov. 2005.
- CAI, H. et al.** Enrichment and culture of spermatogonia from cryopreserved adult bovine testis tissue. *Animal Reproduction Science*, v. 166, p. 109–115, 1 mar. 2016a.
- CAI, H. et al.** Enrichment and in vitro features of the putative gonocytes from cryopreserved testicular tissue of neonatal bulls. *Andrology*, v. 4, n. 6, p. 1150–1158, 1 nov. 2016b.
- CICCARELLI, M. et al.** Donor-derived spermatogenesis following stem cell transplantation in sterile NANOS2 knockout males. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 39, p. 24195–24204, 29 set. 2020.
- COSTOYA, J. A. et al.** Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics*, v. 36, n. 6, p. 653–659, jun. 2004.
- CREEMERS, L. B. et al.** Transplantation of Germ Cells from Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Overexpressing Mice to Host Testes Depleted of Endogenous Spermatogenesis by Fractionated Irradiation. *Biology of Reproduction*, 2002.
- CUI, Y. et al.** The regulatory repertoire of ZBTB16 in porcine immature spermatogonia. *Theriogenology*, v. 236, p. 21–32, 1 abr. 2025.
- DOBRINSKI, I.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L.** Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biology of reproduction*, v. 61, n. 5, p. 1331–9, nov. 1999.
- FAN, Z. et al.** Gene Knockouts in Goats Using CRISPR/Cas9 System and Somatic Cell Nuclear Transfer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 1874, p. 373–390, 2019.
- FAYOMI, A. P. et al.** Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*, 2019.
- GIASSETTI, M. I. et al.** Comparison of Diverse Differential Plating Methods to Enrich Bovine Spermatogonial Cells. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 51, n. 1, p. 26–32, 1 fev. 2016.
- 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, p. 385–401, 15 fev. 2019.
- GOEL, S. et al.** Identification, isolation, and in vitro culture of porcine gonocytes. *Biology of reproduction*, v. 77, n. 1, p. 127–37, 1 jul. 2007.
- GOOSSENS, E.; VAN SAEN, D.; TOURNAYE, H.** Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 28, n. 4, p. 897–907,

abr. 2013.

**HARKEY, M. A et al.** Isolation, genetic manipulation, and transplantation of canine spermatogonial stem cells: progress toward transgenesis through the male germ-line. *Reproduction* (Cambridge, England), v. 146, n. 1, p. 75–90, jul. 2013.

**HAYAMA, T. et al.** Generation of Mouse Functional Oocytes in Rat by Xeno-Ectopic Transplantation of Primordial Germ Cells. *Biology of Reproduction*, v. 91, n. 4, p. 1–9, 2014.

**HAYASHI, K. et al.** Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, v. 146, n. 4, p. 519–32, 19 ago. 2011.

**HAYASHI, K. et al.** Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* (New York, N.Y.), v. 338, n. 6109, p. 971–5, 16 nov. 2012.

**HERMANN, B. P. et al.** Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*, v. 11, n. 5, p. 715–726, 2 nov. 2012.

**HERRID, M. et al.** Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 5, p. 898–905, 2009a.

**HERRID, M. et al.** Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 5, p. 898–905, nov. 2009b.

**HIKABE, O. et al.** Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*, v. 539, n. 7628, p. 299–303, 2016.

**HONARAMOOZ, A. et al.** Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, v. 418, n. 6899, p. 778–781, 2002a.

**HONARAMOOZ, A. et al.** Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, v. 418, n. 6899, p. 778–781, 15 ago. 2002b.

**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, 1 out. 2003.

**HONARAMOOZ, A. et al.** Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 22, n. 2, p. 374–382, fev. 2008.

**HONARAMOOZ, A.; MEGEE, S. O.; DOBRINSKI, I.** Germ cell transplantation in pigs. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 1, p. 21–28, jan. 2002.

**ISHIKURA, Y. et al.** In vitro reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, v. 28, n. 12, p. 2167–2179.e9, 2 dez. 2021.

**IZADYAR, F.** Proliferation and Differentiation of Bovine Type A Spermatogonia During Long-Term Culture. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 1, p. 272–281, 14 out. 2002.

**IZADYAR, F. et al.** Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction* (Cambridge, England), v. 126, n. 6, p. 765–774, dez. 2003.

**JORGE, A. S. et al.** Porcine Germ Cells Phenotype during Embryonic and Adult Development. v. 13, n. 15, p. 2520, ago. 2023.

**JUNG, H.; YOON, M.** Germ Cell Transplantation in Stallion Testes. *Journal of equine veterinary science*, v. 106, 1 nov. 2021.

**KANATSU-SHINOHARA, M. et al.** Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development* (Cambridge, England), v. 132, n. 18, p. 4155–4163, 2005.

**KANATSU-SHINOHARA, M.; TAKEHASHI, M.; SHINOHARA, T.** Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 73, p. 17–23, 2008.

**KANEKO, H. et al.** Generation of Live Piglets for the First Time Using Sperm Retrieved from Immature Testicular Tissue Cryopreserved and Grafted into Nude Mice. *PLoS ONE*, 2013.

**KAWAHARA, T. et al.** Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, v. 92, n. 1, 1 dez. 2021.

**KIM, B. G. et al.** Production of transgenic spermatozoa by lentiviral transduction and transplantation of porcine spermatogonial stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 11, n. 6, p. 458–466, 10 dez. 2014a.

**KIM, S. M. et al.** Effects of extracellular matrices and lectin Dolichos biflorus agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured in vitro. *Reproduction, fertility, and development*, v. 26, n. 2, p. 268–281, 2014b.

**KIM, Y. et al.** Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. *Journal of andrology*, v. 27, n. 2, p. 248–56, 2006.

**KIM, Y. et al.** Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. *Reproduction* (Cambridge, England), v. 136, n. 6, p. 823–31, dez. 2008.

- KIM, Y. H. et al.** GDNF family receptor alpha 1 is a reliable marker of undifferentiated germ cells in bulls. *Theriogenology*, v. 132, p. 172–181, 1 jul. 2019.
- KOGASAKA, Y. et al.** Generation of germ cell-deficient pigs by NANOS3 knockout. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 68, n. 6, p. 361–368, 19 dez. 2022.
- KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L.** Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 11, p. 6487–6492, 27 maio 2003.
- KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L.** Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 47, p. 16489–94, 23 nov. 2004.
- KUIJK, E. W.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J.** The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 138, n. 4, p. 721–731, out. 2009.
- LARA, N. L. M. et al.** DAZL Knockout Pigs as Recipients for Spermatogonial Stem Cell Transplantation. *Cells*, v. 12, n. 21, p. 2582, 1 nov. 2023.
- LEE, K. H. et al.** Identification and in vitro derivation of spermatogonia in beagle testis. *PLoS ONE*, 2014.
- LEE, K. H. et al.** Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. *Scientific Reports*, v. 6, n. November 2015, p. 21919, 2016.
- LEE, W. Y. et al.** Characterization of male germ cell markers in canine testis. *Animal Reproduction Science*, v. 182, p. 1–8, 2017.
- LI, C.-H. et al.** Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring. *Cell Research*, v. 27, n. 2, p. 241–252, fev. 2017.
- LU, Y. et al.** Livestock induced pluripotent stem cells. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. SUPPL.4, p. 72–76, 2012.
- MA, W. et al.** The Safe Recipient of SSC Transplantation Prepared by Heat Shock With Busulfan Treatment in Mice. *Cell transplantation*, v. 27, n. 10, p. 1451–1458, 1 out. 2018.
- MA, W. W. W. W. et al.** Efficient and safe recipient preparation for transplantation of mouse spermatogonial stem cells: pretreating testes with heat shock. *Biology of reproduction*, v. 85, n. 4, p. 670–7, 1 out. 2011.
- MIYAZAKI, T. et al.** Signal regulatory protein alpha is a conserved marker for mouse and rat spermatogonial stem cells†. *Biology of reproduction*, v. 108, n. 4, p. 682–693, 1 abr. 2023.
- MURASE, Y. et al.** In vitro reconstitution of epigenetic reprogramming in the human germ line. *Nature*, v. 631, n. 8019, p. 170–178, jul. 2024.
- NAGANO, M.; MCCARREY, J. R.; BRINSTER, R. L.** Primate Spermatogonial Stem Cells Colonize Mouse Testes 1. v. 1416, p. 1409–1416, 2001.
- NAKAMI, W. et al.** Culture of spermatogonial stem cells and use of surrogate sires as a breeding technology to propagate superior genetics in livestock production: A systematic review. *Veterinary World*, v. 14, n. 12, p. 3235–3248, dez. 2021.
- NICHOLLS, P. K. et al.** Mammalian germ cells are determined after PGC colonization of the nascent gonad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 51, p. 25677–25687, 17 dez. 2019.
- OATLEY, J. M. et al.** Spermatogenesis and germ cell transgene expression in xenografted bovine testicular tissue. *Biology of reproduction*, v. 71, n. 2, p. 494–501, ago. 2004.
- OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L.** Spermatogonial Stem Cells. *Methods in Enzymology*, v. 419, n. 06, p. 259–282, 2006.
- OATLEY, J. M.; REEVES, J. J.; MCLEAN, D. J.** Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. *Biology of reproduction*, v. 71, n. 3, p. 942–947, set. 2004.
- OATLEY, M. J. et al.** Conditions for Long-Term Culture of Cattle Undifferentiated Spermatogonia. *Biology of reproduction*, v. 95, n. 1, 1 jul. 2016.
- OATLEY, M. J.; RACICOT, K. E.; OATLEY, J. M.** Sertoli Cells Dictate Spermatogonial Stem Cell Niches in the Mouse Testis. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 4, p. 639–645, abr. 2011.
- 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.
- OGAWA, T. et al.** Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biology of reproduction*, v. 60, n. 2, p. 515–21, fev. 1999.
- OGAWA, T. et al.** Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Medicine*, v. 6, n. 1, p. 29–34, jan. 2000.

- OIKAWA, M. et al.** Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats. *Science* (New York, N.Y.), v. 376, n. 6589, 8 abr. 2022.
- PARK, J. E. et al.** Porcine spermatogonial stem cells self-renew effectively in a three dimensional culture microenvironment. *Cell Biology International*, v. 41, n. 12, p. 1316–1324, 1 dez. 2017a.
- PARK, K. E. et al.** Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Scientific Reports*, v. 7, 10 jan. 2017b.
- PESSÔA, L. V. DE F.; BRESSAN, F. F.; FREUDE, K. K.** Induced pluripotent stem cells throughout the animal kingdom: Availability and applications. *World journal of stem cells*, v. 11, n. 8, p. 491–505, 26 ago. 2019.
- PIERI, N. C. G. et al.** Immunolocalization of proteins in the spermatogenesis process of canine. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, p. 1–7, 2016.
- PIERI, N. C. G. et al.** Xenotransplantation of canine spermatogonial stem cells ( cSSCs ) regulated by FSH promotes spermatogenesis in infertile mice. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019a.
- PIERI, N. C. G. et al.** Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. *Veterinary Research Communications*, v. 43, n. 1, 2019b.
- PIERI, N. C. G. et al.** Porcine Primordial Germ Cell-Like Cells Generated from Induced Pluripotent Stem Cells Under Different Culture Conditions. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 18, n. 5, p. 1639–1656, 1 jun. 2022.
- RATHI, R. et al.** Germ cell fate and seminiferous tube development in bovine testis xenografts. *Reproduction*, 2005.
- RATHI, R. et al.** Germ cell development in equine testis tissue xenografted into mice. *Reproduction* (Cambridge, England), v. 131, n. 6, p. 1091–8, jun. 2006.
- RATHI, R.; MEGEE, S. O.; HONARAMOOZ, A.** Xenografting of sheep testis tissue and isolated cells as a model for preservation of genetic material from endangered ungulates. 2008.
- REDING, S. C. et al.** THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction* (Cambridge, England), v. 139, n. 5, p. 893–903, maio 2010a.
- REDING, S. C. et al.** THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction* (Cambridge, England), v. 139, n. 5, p. 893–903, maio 2010b.
- SAHARE, M. et al.** The role of signaling pathways on proliferation and self-renewal of cultured bovine primitive germ cells. *Reproductive medicine and biology*, v. 14, n. 1, p. 17–25, 1 jan. 2014.
- SAHARE, M. et al.** Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells. *Reproduction, fertility, and development*, v. 28, n. 12, p. 2039–2050, 2016.
- SCHLATT, S. et al.** Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 6, p. 2331–2335, jun. 2003.
- SCHLATT, S. et al.** Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. *Human Reproduction*, v. 21, n. 2, p. 384–389, 2006.
- SHINOHARA, T.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L.**  $\beta$ 1- and  $\alpha$ 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 10, p. 5504–5509, 11 maio 1999.
- SNEDAKER, A. K.; HONARAMOOZ, A.; DOBRINSKI, I.** A game of cat and mouse: xenografting of testis tissue from domestic kittens results in complete cat spermatogenesis in a mouse host. *Journal of andrology*, v. 25, n. 6, p. 926–30, 2004.
- SONG, Y. et al.** Postnatal development of mouse spermatogonial stem cells as determined by immunophenotype, regenerative capacity, and long-term culture-initiating ability: a model for practical applications. *Scientific reports*, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.
- 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, 2009.
- SUYATNO et al.** Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes. *Molecular reproduction and development*, v. 85, n. 3, p. 236–249, 1 mar. 2018.
- TAGELENBOSCH, R. A. J.; DE ROOIJ, D. G.** A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 290, n. 2, p. 193–200, 1 dez. 1993.
- TIPTANAVATTANA, N. et al.** Characterization and in vitro culture of putative spermatogonial stem cells derived from feline testicular tissue. *The Journal of reproduction and development*, v. 59, n. 2, p. 189–95, 2013.
- TRAVIS, A J.; KIM, Y.; MEYERS-WALLEN, V.** Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 44 Suppl 2, p.

---

22–8, jul. 2009.

**TSUDA, M. et al.** Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, v. 301, n. 5637, p. 1239–1241, 29 ago. 2003.

**VANSANDT, L. M.; PUKAZHENTHI, B. S.; KEEFER, C. L.** Molecular markers of spermatogonial stem cells in the domestic cat. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, v. 47 Suppl 6, p. 256–260, dez. 2012.

**XI, H.-M. et al.** Recent advances in isolation, identification, and culture of mammalian spermatogonial stem cells. *Asian Journal of Andrology*, v. 24, n. 1, p. 5–14, 11 jun. 2021.

**YAMASHIRO, C. et al.** Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture. *Nature protocols*, v. 15, n. 4, p. 1560–1583, abr. 2020.

**YOU, X. et al.** Retinoic acid-induced differentiation of porcine prospermatogonia in vitro. *Theriogenology*, v. 198, p. 344–355, 1 mar. 2023.

**ZENG, W. et al.** Viral transduction of male germline stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation in pigs. *Biology of reproduction*, v. 88, n. 1, p. 27, jan. 2013.

**ZHANG, L. et al.** Single-cell RNA-sequencing reveals the dynamic process and novel markers in porcine spermatogenesis. *Journal of animal science and biotechnology*, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

**ZHANG, P. et al.** Long-Term Propagation of Porcine Undifferentiated Spermatogonia. *Stem Cells and Development*, v. 26, n. 15, p. 1121–1131, 1 ago. 2017.

**ZHAO, X. et al.** Isolation and in vitro expansion of porcine spermatogonial stem cells. v. 57, n. 2, p. 210–220, 1 fev. 2022.

**ZHENG, Y. et al.** Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 147, n. 3, p. R65-74, mar. 2014.

---