

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
Departamento de Morfologia - Laboratório de Biologia Celular

Raquel de Lima Leite Soares Alvarenga

**HIV-1 E CÉLULAS GERMINATIVAS HUMANAS: POSSÍVEIS VIAS E
MECANISMOS DE INFECÇÃO**

Belo Horizonte

2016

Raquel de Lima Leite Soares Alvarenga

**HIV-1 E CÉLULAS GERMINATIVAS HUMANAS: POSSÍVEIS VIAS E
MECANISMOS DE INFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dr^a. Gleide Fernandes de Avelar

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França

Área de concentração: Biologia celular

Belo Horizonte

2016

043

Alvarenga, Raquel de Lima Leite Soares.

HIV-1 e células germinativas humanas: possíveis vias e mecanismos de infecção [manuscrito] / Raquel de Lima Leite Soares Alvarenga. – 2016.

75 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dr^a. Gleide Fernandes de Avelar. Coorientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. HIV. 3. Sêmen. 4. Células Germinativas. 5. Seminoma. 6. Genitália Masculina. I. Avelar, Gleide Fernandes de. II. França, Luiz Renato de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
RAQUEL DE LIMA LEITE SOARES ALVARENGA**

161/2016
entrada
2º/2012
2012742933

Às treze horas do dia 29 de julho de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "HIV-1 E CÉLULAS GERMINATIVAS HUMANAS: POSSÍVEIS VIAS E MECANISMOS DE INFECÇÃO", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Gleide Fernandes de Avelar (Orientadora)**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Gleide Fernandes de Avelar (Orientadora)	UFMG	APROVADA
Dr. Luiz Renato de França (Co-Orientador)	UFMG	APROVADA
Dra. Rossana Correa Netto de Melo	UFJF	APROVADA
Dr. Ricardo Mello Marinho	FCM	APROVADO
Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda	UFMG	APROVADA
Dr. Fernando Marcos dos Reis	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de julho de 2016.**

Dr^a. Gleide Fernandes de Avelar (Orientadora) Gleide Fernandes de Avelar

Dr. Luiz Renato de França (Co-Orientador) LUIZ RENATO DE FRANÇA

Dr^a. Rossana Correa Netto de Melo Rossana

Dr. Ricardo Mello Marinho Ricardo Mello Marinho

Dr^a. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda Samyra

Dr. Fernando Marcos dos Reis Fernando Marcos dos Reis

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

[Handwritten signature and stamp]
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLÓGIA CELULAR

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Renato de França, pelo qual tenho grande admiração, pela confiança;

À Profa. Gleide Fernandes de Avelar, pela orientação;

À Dra. Nathalie Dejuq-Rainsford, pela oportunidade única de trabalhar no INSERM ;

À Dominique Mahé, pelo tempo passado comigo;

Aos meus filhos, Renato e Pedro, meus verdadeiros grandes heróis;

Ao meu marido Rodrigo, pela paciência e apoio;

Ao meus pais, Paulo e Mercês, pelo apoio incondicional ;

Aos meus sogros Oscar e Aideé, pela ajuda ;

Aos meus colegas do Biocel, pelo apoio e ajuda ;

À Giulia, Samyra, Anne-Pascale, Anna, pela ajuda inestimável na execução dos experimentos;

À Deus, pela força em muitos momentos.

RESUMO

O sêmen representa o principal vetor de disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo. A origem das partículas virais livres e das células infectadas presentes no fluido seminal, bem como a natureza das interações entre o HIV e os espermatozoides e as demais células espermatogênicas, permanecem ainda muito pouco conhecidas. O fato de número crescente de estudos terem descrito a persistência de vírus no sêmen de até 30% de indivíduos submetidos a diferentes combinações de tratamentos antirretrovirais, sugere que o sistema genital masculino representa um santuário anatômico/farmacológico que impede a erradicação do vírus no organismo. Neste contexto, é necessário investigar a permissividade das células espermatogênicas ao HIV, bem como a contribuição delas para a carga viral do sêmen. A proposta deste estudo foi a de se utilizar a cultura de células testiculares isoladas para estudar a natureza das interações entre as células germinativas testiculares e o HIV-1 in vitro. Foi utilizada também a linhagem de células germinativas derivadas de seminoma, as TCam-2. Estas células foram analisadas para diferentes etapas da infecção: entrada viral, síntese e integração de DNA viral, síntese de proteína viral e produção viral. Foi observado que a transcrição reversa e integração do HIV em células Tcam-2 ocorre quando a entrada é favorecida por um pseudovírus VSV-HIV de amplo tropismo e após 24 horas de exposição à cloroquina. Foi também demonstrada a produção de partículas virais pelas células Tcam-2. Não foi possível confirmar a reinfeção com os vírus produzidos. Confirmou-se a ligação do vírus HIV-1 às células germinativas testiculares. Foi possível sugerir a internalização das partículas p24, tanto para as células Tcam-2 quanto para células germinativas testiculares através do estudo de secções seriadas obtidas por microscopia confocal. Estes resultados, em conjunto, sugerem que o HIV-1 pode ser internalizado por células espermatogênicas em cultura, embora este evento seja raro. Estudos em andamento visam elucidar a ocorrência de eventos subsequentes (transcrição reversa, integração).

Palavras-Chave: HIV. Sêmen. Células germinativas. TCam-2. Sistema Genital Masculino. Homem.

ABSTRACT

Semen is the most important mechanism for spreading of the human immunodeficiency virus (HIV) infection in the world. The source of free viral particles and the infected cells present in the seminal fluid, as well as the nature of the interactions between HIV and other spermatozoa and spermatogenic cells are still barely known. The fact that increasing numbers of studies have described the persistence of virus in semen up to 30% of patients undergoing different combinations of antiretroviral treatments, suggests that the male genital system is an anatomical/pharmacological sanctuary that prevents the eradication of the virus in the body. In this context, it is necessary to investigate the permissiveness of spermatogenic cells to HIV, as well as the contribution of these cells to the viral load of semen. The purpose of this study was to use the culture of isolated testicular cells to study the nature of interactions between testicular germ cells and HIV-1 in vitro. It was also used the germ cell lineage derived from seminoma, the TCAM-2. These cells were analyzed for different phases of infection: viral entry, viral DNA synthesis and integration of viral protein synthesis and viral production. It was observed that the reverse transcription and integration of HIV to the TCAM-2 cells occur when the input is favored by a large tropism VSV-HIV pseudovirus and after 24 hours of exposure to chloroquine. It was also demonstrated the production of viral particles by TCAM-2 cells, however we were unable to confirm the re-infection with the virus produced. On the other hand, it was demonstrated the binding of the HIV-1 virus to testicular germ cells. The internalization of p24 particles to both TCAM-2 and testicular germ cells was evaluated through the study of serial sections obtained by confocal microscopy. These results together suggest that HIV-1 can be internalized by spermatogenic cells in culture, although this is a rare event. Also, further studies have to be done in order to evaluate the subsequent events, for instance reverse transcription and integration, after the virus entrance in testicular germ cells.

Keywords: HIV. Semen. Germ cells. TCAM-2. Male genital system. Man.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR3	Receptor de quimiocina tipo 3
CCR5	Receptor de quimiocina tipo 4
CD4	<i>Cluster</i> de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster</i> de diferenciação 8
CSFE	Marcador de células em proliferação (<i>CellTrace</i>)
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 5
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN DC	<i>Specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin</i>
DDX4	<i>DEAD-box polypeptide 4 (VASA)</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRAQ5	Corante lipofílico fluorescente de DNA
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGF-3	<i>Fibroblast Growth Factor-3</i>
GalCer	Galactosilceramida
GDNF	<i>Glial cell line Derived Neurotrophic Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent protein</i>
GRFA1	<i>GDNF family receptor alpha-1 (GFRα1)</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA-1	<i>Human leukocyte antigen system</i>
HS	Heparan sulfato
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
MAGEA4	<i>Melanoma-associated antigen 4</i>
MR	Receptor de manose
NANOS2	<i>Nanos homolog 2 Drosophila antibody</i>
PBMC	<i>Peripheral Mononuclear Blood Cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RANTES CCL5	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Retro-transcriptase
SFB	Soro fetal bovino
SSEA4	<i>Stage-specific embryonic antigen 4</i>
STRA8	<i>Stimulated by retinoic acid homolog antibody</i>
THY1 CD90	<i>Cluster of Differentiation 90</i>
VASA	<i>DEAD-box polypeptide 4 (DDX4)</i>
VSV	Vírus da Estomatite Vesicular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção e processamento de amostras do testículo para cultura e criopreservação.....	17
Figura 2 - Esquema representativo de procedimento clínico para a preservação da fertilidade através do congelamento de fragmentos testiculares e transplante autólogo de células-tronco espermatogoniais.....	19
Figura 3 - Progressão das células testiculares humanas em cultivo do dia 1 ao dia 23 resultando na formação in vitro de organoide alongado.....	32
Figura 4 - Caracterização das culturas primárias de células testiculares usando-se microscopia confocal e citometria de fluxo.....	34
Figura 5 - Culturas primárias de células testiculares mantidas até 23 dias.....	35
Figura 6 - Desenvolvimento de organoides a partir de células testiculares em cultivo primário ao longo de 23 dias.....	36
Figura 7 - Imunohistoquímica dos organoides testiculares formados in vitro após cultivo primário de células testiculares.....	37
Figura 8 - Cultivo primário de células testiculares (18o dia de cultura) HIV-1/Bal, 16h após infecção.....	38
Figura 9 - Cultivo primário de células testiculares HIV-1/Bal, 4h após infecção.....	39
Figura 10 - Cultivo primário de células testiculares HIV-1/gfpvpr após infecção.....	39
Figura 11 - Resultados do ELISA binding Assay para células testiculares isoladas infectadas (n=8) com HIV-1 cepas R5 SF162 (A) e X4 IIIb (B), nas concentrações de 25 e 75 ng e nas temperaturas 4°C e 37°C.....	40
Figura 12 - Resultados do ELISA binding Assay para células testiculares isoladas infectadas com HIV-1 cepa R5 SF162.....	41
Figura 13 - Células testiculares de co-cultivo primário em contato com células Jurkat infectadas com HIV-1/Ad8.....	42
Figura 14 - Co-cultura de células testiculares e células Jurkat infectadas com HIV-1/pnl3...	42
Figura 15: PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células germinativas totais, na presença e ausência da nevirapina e cloroquina, nos dias 1, 2 e 3 após infecção (HIV-1).....	43

Figura 16 - Resultados das análises de citometria de fluxo das células germinativas após infecção com o HIV-1, dias 5 e 15 dias após a infecção.....	43
Figura 17 - Células de cultivo primário infectadas com o lentivírus pseudo VSV em culturas à fresco.....	44
Figura 18 - Culturas primárias de células testiculares infectadas in vitro com pseudovírus VSV.....	45
.	
Figura 19 - Culturas primárias de células testiculares infectadas in vitro com pseudovírus VSV (amostra após descongelamento) onde são observadas células VASA/Alexa 594, VSV/GFP, e núcleos corados com Draq5.....	46
Figura 20 - Resultados das análises de citometria de fluxo das células Jurkat, PBMC e TCam-2 após infecção com o pseudovírus VSV, 3 dias após a infecção.....	47
Figura 21 - PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células da linhagem TCam-2, na presença e ausência da nevirapina, no dia 1 após infecção (VSV-G).....	48
Figura 22 - PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células da linhagem TCam-2, na presença e ausência da nevirapina, nos períodos 24-72 horas após infecção (HIV-JR-CSF)	49
.....	
Figura 23 - PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células da linhagem TCam-2, na presença e ausência da nevirapina, após exposição à cloroquina (4h), nos períodos 24-72 horas após infecção (HIV-JR-CSF, A) e 24 após infecção horas (VSV-G, B).....	49
Figura 24 - Detecção do p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1 (IIIb), tripsina 4h pós-infecção, em lamínulas cobertas com poli-L-lisina, onde evidenciou-se CFSE/FITC, p24/Alexa 594, e núcleo Draq5 corado em azul.....	50
Figura 25 - Detecção do p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1 JR-CSF, tripsina 4h pós-infecção, em lamínulas cobertas com poli-L-lisina, onde evidenciou-se CFSE/FITC, p24/Alexa 594, e núcleo Draq5 corado em azul.....	51
Figura 26 - Detecção do p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1 (SF-162 e ARP-1114), tripsina 4h pós-infecção, em lamínulas cobertas com poli-L-lisina, onde evidenciou-se CFSE/FITC, p24/Alexa 594, e núcleo Draq5 corado em azul.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Vírus da imunodeficiência humana no Sistema Genital Masculino	11
1.2 Cultivo de células-tronco espermatogoniais	15
1.3. Congelamento de Tecidos – Testículo	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Desenvolvimento de protocolo de cultivo primário de células germinativas testiculares	21
4.2. Extração de Células Germinativas de testículo humano pós-orquiectomia	22
4.2.1 <i>Isolamento das células germinativas e início da cultura</i>	22
4.2.2 <i>Congelamento</i>	23
4.2.3 <i>Descongelamento</i>	23
4.3. Infecção das células TCam-2, Jurkat e PBMC	24
4.3.1. <i>Cepas de vírus e pseudovírus utilizadas</i>	24
4.3.2 <i>Procedimento das Infecções das culturas celulares</i>	25
4.4 A pesquisa do DNA viral por PCR quantitativo (qPCR)	26
4.5. Detecção por citometria de fluxo	27
4.6 Infecção das culturas primárias de células testiculares (vírus livre)	27
4.7. Infecções das culturas primárias de células testiculares (célula-célula)	28
4.8. Imunocitoquímica e imunohistoquímica	28
4.9. Contagem diferencial	29
4.10. Análise Estatística	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Caracterização da cultura primária de células testiculares	30
5.1.1 <i>Progressão das células testiculares adultas em cultura</i>	30
5.1.2 <i>Caracterização das células testiculares em cultura</i>	30
5.1.3 <i>Diferenciação e reorganização de células testiculares adultas em cultura</i>	34
5.2 Infecção de células germinativas em cultivo primário pelo HIV	37
5.2.1 <i>ELISA binding Assay</i>	39
5.2.2 <i>Infecção célula-célula</i>	40
5.2.3 <i>Transcrição reversa do HIV-1 nas células germinativas</i>	41
5.3. Infecção de células germinativas em cultivo primário pelos pseudovírus VSV	43
5.3.1. <i>Culturas a fresco</i>	43
5.3.2. <i>Culturas após descongelamento de fragmentos de testículo</i>	44
5.4. Infecção nas células da linhagem TCam-2	45
5.4.1. <i>Citometria de Fluxo</i>	45
5.4.2 <i>Transcrição reversa do HIV-1 em células TCam-2</i>	46
5.5. Efeitos da Cloroquina em células Tcam-2 infectadas com HIV (JR-CSF) e VSV-G	48
5.6 Detecção da p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1	49
6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da imunodeficiência humana no Sistema Genital Masculino

O sêmen representa o principal vetor de disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo. A origem das partículas virais livres e das células infectadas presentes no fluido seminal, bem como a natureza das interações entre o HIV e os espermatozoides e as demais células espermatogênicas, permanecem ainda muito pouco conhecidas. Estudos filogenéticos recentes indicam que as partículas virais presentes no sêmen são em parte produzidas localmente e não provém, portanto, unicamente de difusão passiva a partir do compartimento sanguíneo, tanto no homem (Anderson *et al*, 2010; Pillai *et al*; 2005; Ghosn *et al*, 2004) quanto no macaco (Le Tortorec & Dejucq-Rainsford, 2010a; 2010b; Whitney *et al*, 2011; Houzet *et al*, 2014). Conforme é sabido, em primatas o fluido seminal é constituído de células e secreções provenientes dos testículos, dos epidídimos, da próstata, das vesículas seminais e das glândulas bulbo-uretrais. Recentemente, foi demonstrado que em todos estes órgãos ocorre a infecção por HIV (no homem *in vivo* e *in vitro*) (Roulet *et al*, 2006; Le Tortorec *et al*, 2008b; Deleage *et al*, 2011) e por SIV (vírus da imunodeficiência símia) (no macaco *in vivo*; Le Tortorec *et al*, 2008a).

As terapias antirretrovirais atuais visam suprimir de forma duradoura a carga viral e preservar ou mesmo restaurar a imunidade. Assim, elas permitem melhorar consideravelmente a expectativa e a qualidade de vida dos indivíduos com acesso as mesmas. Entretanto, a existência de santuários virais impede a erradicação do vírus no organismo. Os santuários virais são sítios celulares ou anatômicos refratários à ação de uma ou várias drogas antivirais, onde o vírus persiste de maneira silenciosa (infecção latente) ou continua a se replicar clandestinamente (infecção críptica crônica). Existem algumas evidências de que o sistema genital masculino (SGM) representa um santuário farmacológico. Neste sentido, número crescente de estudos tem descrito a persistência de vírus (partículas infecciosas, DNA e RNA viral) liberados, de maneira intermitente, no sêmen de 5 a 30% de indivíduos submetidos a diferentes combinações de tratamentos antirretrovirais, com carga viral sanguínea indetectável por vários meses ou mesmo anos (Lambert-Niclot, *et al*, 2012; Pasquier *et al*, 2012; Halfon *et al*, 2010, Lambert-Niclot *et al*, 2010; Sheth *et al*, 2009; Marcelin *et al*, 2008; Pasquier *et al*, 2008; Zhang *et al*, 1998). Esta persistência, que pode atingir a escala de vários Log₁₀/ml (milhões), não está correlacionada às concentrações sub-ótimas dos antirretrovirais no sêmen, ou a uma combinação específica de antirretrovirais,

e acontece na ausência de outras infecções sexualmente transmissíveis (DSTs), que sabidamente aumentam a liberação do vírus no sêmen (Lambert-Niclot *et al*, 2012). Mais recentemente ainda, foi demonstrado que a excreção de vírus no sêmen dos indivíduos tratados não está correlacionada com o nível da carga viral sanguínea residual e de DNA nas células sanguíneas mononucleares (PBMC - Peripheral Mononuclear Blood Cells), que foram avaliadas por técnicas bastante sensíveis (Lambert-Niclot, *et al*, 2012). Somente uma carga viral seminal elevada antes do tratamento foi associada à liberação persistente do HIV no sêmen, independentemente do tipo de tratamento (Sheth *et al*, 2009) ou de outras DSTs (Sheth *et al*, 2012), bem como da ativação de linfócitos T originados do sêmen, mas não do sangue. Camus *et al* (2016) mostraram que o efeito do plasma seminal na infecção pelo HIV depende do status do doador (infectado ou não pelo HIV) e do tropismo viral (R5 ou X4).

Outras evidências sugerem que o SGM pode constituir um reservatório para o HIV (revisado em Le Tortorec & Dejucq-Rainsford, 2010a; 2010b). O fato da cinética e da taxa de proliferação do vírus, bem como da diversidade das cepas resistentes aos tratamentos diferirem entre o plasma sanguíneo e o fluido seminal (Ghosn *et al*, 2004; Kroodsma *et al*, 1994; Eron *et al*, 1998; Eyre *et al*, 2000), reforça a hipótese de que as partículas virais presentes no sêmen provêm de um compartimento biológico separado.

Damouche *et al* (2015) mostraram uma detecção de DNA do HIV em células T CD4⁺ de tecido adiposo, o que sugere que este tecido também pode atuar como reservatório de HIV em pacientes avirêmicos após terapia antirretroviral de longo prazo.

Recentemente, o grupo de pesquisa na França, liderado pela nossa colaboradora, a Dra. Nathalie Dejucq-Rainsford, demonstrou que um tratamento antirretroviral de curto prazo, iniciado durante a fase crônica da infecção, em macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*), não exerce influência significativa sobre a presença de DNA e de RNA viral nos órgãos do SGM (Moreau *et al*, 2012). Ainda, foi demonstrada a persistência de replicação viral em órgãos tais como linfonodos e intestinos em pacientes humanos e em macacos, submetidos a tratamento antirretroviral eficaz no sangue, que estava associado à baixa penetração das moléculas antirretrovirais nestes tecidos (Cohen, 2011; Bourry *et al*, 2010). Dentre os órgãos do SGM, em razão da presença de bombas de efluxo da família de transportadores ABC em diferentes tipos celulares, o testículo humano representa um santuário farmacológico bem conhecido (Robillard *et al*, 2012; Bart *et al*, 2004; Melaine *et al*, 2002). Estas bombas limitam o acesso das drogas ao testículo, em particular os inibidores de replicação do HIV (Choo *et al*, 2000; Livni *et al*, 2004). Em relação a outros órgãos do SGM (vesícula seminal, próstata e epidídimo), cujas secreções constituem mais de 90% do fluido seminal, a difusão dos

antirretrovirais e a expressão das bombas de efluxo não são ainda conhecidas. Matusali *et al* (2015) mostraram que a liberação de SIV ocorre no sêmen de macacos mesmo após terapia antirretroviral que reduz drasticamente a viremia no sangue. Esta liberação é independente de menores concentrações das drogas no sêmen, testículos, epidídimo, vesículas seminais ou próstata.

Neste sentido, o entendimento da sensibilidade aos atuais tratamentos antiretrovirais dos órgãos e células infectados pelo HIV/SIV no SGM, bem como a contribuição dos mesmos para a carga viral do sêmen, é essencial para se desenvolver novas estratégias terapêuticas visando erradicar o vírus.

Os retrovírus endógenos, que compõem cerca de 8% do nosso genoma, resultam de uma infecção antiga da linhagem germinativa. Recentemente, a presença de lentivírus endógenos foi, pela primeira vez, demonstrada no genoma de mamíferos (Katzourakis *et al*, 2007; Gifford *et al* 2008; Gilbert *et al*, 2009), incluindo-se várias espécies de lemurianos (Gifford *et al* 2008; Gilbert *et al*, 2009), evidenciando assim a invasão das células germinativas de primatas pelos lentivirus (SIV). Por vários anos, a questão da associação do HIV aos espermatozoides e às demais células espermatogênicas tem sido objeto de controvérsias (revisado em Le Tortorec & Dejuq-Rainsford, 2010a; 2010b).

Recentemente, foi demonstrado que o HIV pode se aderir à superfície dos espermatozoides isolados, via receptores celulares alternativos como o heparan sulfato (Ceballos *et al*, 2009) e manose (Cardona-Maya *et al*, 2011), e assim transmitir o vírus aos linfócitos T CD4+, macrófagos e células dendríticas, ativando estas últimas (Ceballos *et al*, 2009). Estes resultados corroboram aqueles de estudos anteriores (Bagasra *et al*, 1988; Dussaix *et al*, 1993; Bacetti *et al*, 1994; Scofield *et al*, 1994; Cardona-Maya *et al*, 2011; Jadhav *et al*, 2011). Desta forma, os espermatozoides poderiam agir como transportadores do HIV e participar da transmissão sexual do vírus. Embora seja estabelecido que os espermatozoides não são capazes de propiciar a replicação do HIV, a presença do DNA viral em pequeno número destas células constitui sempre objeto de debates (revisado em Le Tortorec & Dejuq-Rainsford, 2010a; 2010b).

Os espermatozoides obtidos através de beneficiamento do sêmen somente podem ser utilizados para a procriação através de técnicas de reprodução assistida nos casais sorodiscordantes, quando o ácido nucleico viral não é detectado através de PCR. Com este procedimento, nenhum caso de transmissão da infecção foi ainda documentado (revisado em Le Tortorec & Dejuq-Rainsford, 2010a). Entretanto, utilizando-se de técnicas sensíveis de *nested* PCR (Jadhav *et al*, 2011; Muciaccia *et al*, 2007; Cardona-Maya *et al*, 2009), PCR *in*

situ (Muciaccia *et al.*, 2007; Bagasra *et al.*, 1994) e FISH (Wang *et al.*, 2011), diferentes grupos de pesquisa detectaram o DNA do HIV em número restrito de espermatozoides ejaculados, alguns deles apresentando morfologia anormal (Muciaccia *et al.*, 2007). Baseado nestes resultados não se pode excluir que um pequeno número destes espermatozoides possa conter o DNA viral. Através do uso de microscopia eletrônica de transmissão foi demonstrado a presença de partículas de HIV aderidas ou internalizadas nos espermatozoides beneficiados, sendo também demonstrada a transferência destas partículas para ovócitos em experimentos de fertilização *in vitro* (Bacetti *et al.*, 1994). Estes resultados não foram confirmados por outros pesquisadores (Pudney *et al.*, 1999). No entanto, pelo fato da qualidade e expectativa de vida de pacientes HIV positivos ter melhorado consideravelmente devido às terapias antirretrovirais, esta questão torna-se crucial uma vez que número crescente destes pacientes tem procurado tratamentos com técnicas de reprodução assistida, para evitar a contaminação da parceira e do embrião.

Em macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*), o RNA do SIV foi detectado por hibridização *in situ* em células espermatogênicas isoladas (Le Tortorec *et al.*, 2008a, 2008b). Esta detecção poderia estar ligada à adesão de partículas virais à superfície destas células, conforme descrito em células dendríticas foliculares, e/ou replicação destas partículas. Utilizando-se técnica de imunohistoquímica, a replicação de partículas virais em espermatogônias tronco foi sugerida no macaco de rabo de porco (*Macaca nemestrina*) através de detecção da proteína p27 (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2007).

Os trabalhos anteriores realizados pelo grupo da Dra. Nathalie Dejuq-Rainsford mostraram que há infecção produtiva de HIV-1 nos macrófagos residentes nas vesículas seminais humanas *in vitro* (Deleage *et al.*, 2011) e na próstata (Moreau *et al.*, 2012; Le Tortorec *et al.*, 2008b) pela cepa R5 (Houzet *et al.*, 2014). Em culturas organotípicas de testículo humano foi confirmada, através de hibridização *in situ*, a presença de receptores alternativos do HIV em macrófagos CD68, CD4+, assim como CXCR4 e CCR5 (Roulet *et al.*, 2006a; 2006b). Esta localização estava restrita ao compartimento intersticial do testículo.

A proposta dos experimentos descritos a seguir foi a de se utilizar a cultura de células testiculares para avaliar a infecção das células germinativas pelo HIV *in vitro*. Devido à complexidade deste sistema de cultivo, foi utilizada também a linhagem de células germinativas derivadas de seminoma humano, as células TCam-2. Estas células são facilmente mantidas e multiplicadas em cultura, tornando-se ferramenta bastante útil nos experimentos de infecção, caracterização e citometria de fluxo, principalmente naqueles experimentos onde a pureza das células na cultura é requerida, como ELISA e PCR.

Ainda, a oportunidade única de poder obter amostras de testículo humano, com a finalidade de se desenvolver protocolos de cultura de células germinativas para a infecção pelo HIV, resultou em novas possibilidades de estudo. Assim, além de permitir a caracterização das células cultivadas, foram testados e aplicados novos protocolos para a criopreservação das amostras testiculares excedentes.

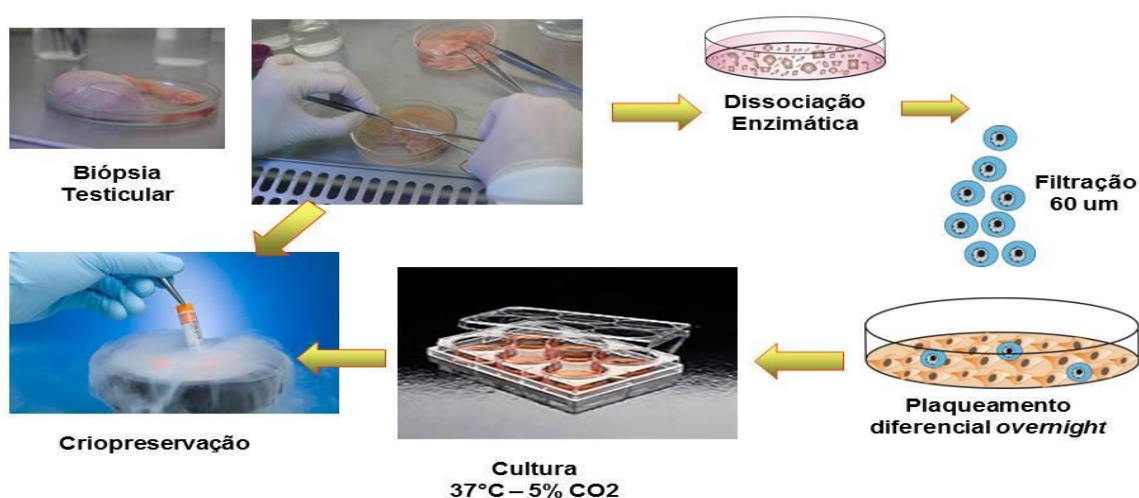
1.2 Cultivo de células-tronco espermatogoniais

As espermatogônias-tronco (SSC-Spermatogonia Stem Cells) têm a capacidade de se autorrenovar e de se diferenciar produzindo espermatozoides. Antes consideradas unipotentes, recentemente foi demonstrada sua pluripotência pela capacidade de originar os três folhetos embrionários (Conrad *et al.*, 2008; 2014; Golestaneh *et al.*, 2009; Kossack *et al.*, 2009). Assim, esta abordagem oferece uma fonte alternativa de células pluripotentes para uso terapêutico em doenças degenerativas e preservação da fertilidade. O sistema de cultura de SSC (Figura 1) permite a investigação das suas características biológicas únicas. No entanto, o conhecimento atual dos marcadores moleculares que caracterizam as SSC humanas é ainda limitado, devido a vários fatores como o pouco acesso a amostras testiculares para pesquisa; a quantidade pequena de células-tronco nos túbulos seminíferos; às variações individuais entre testículos de diferentes indivíduos, a falta de marcadores de superfície específicos; a ausência de um sistema de cultivo capaz de suportar sua autorrenovação; e a ausência de técnicas eficientes para a purificação e isolamento destas células para pesquisa (Conrad *et al.*, 2008, 2014; Golestaneh *et al.*, 2009; Kossack *et al.*, 2009; Kanatsu-Shinohara, 2003, 2005; Koruji *et al.* 2012; Sadri-Ardekani, 2009, 2011; Lim *et al.*, 2010, 2013; Martin & Seandel, 2013; Piravar *et al.*, 2013; Gorharbakhsh *et al.*, 2013; Seandel, *et al.*, 2007; Chikhoskaya *et al.*, 2013, Heim *et al.*, 2012; Nickkolgh *et al.*, 2014a, 2014b).

Recentemente três grupos relataram, de forma independente, a formação de células embrionárias-like (*Embryonic-Stem cell-like*) em cultura de células testiculares humanas sob condições específicas (Conrad *et al.*, 2008; 2014; Golestaneh *et al.*, 2009; Kossack *et al.*, 2009). Merece ser ressaltado que é necessário diferenciar espermatogônias-tronco de origem germinativa, das chamadas TMSC, ou Células Testiculares Multipotentes do Estroma Testicular (*Multipotent Stromal Cells*, TMSCs). Os marcadores como o SSEA4, TRA1-81, GPR125 ou GFRA1, antes considerados espermatogônia específicos, são expressos pelos dois tipos celulares. No entanto, o gene *DEAD-box polypeptide 4* (DDX4), mais conhecido como

VASA, em combinação com o PLZF, SALL4, MAGEA4, possibilitou marcação específica das espermatogônias de macaco mantidas em cultura (Eildermann *et al*, 2012). O gene VASA é expresso exclusivamente em células germinativas masculinas e femininas, sendo necessário para a progressão da meiose na espermatogênese. O VASA está distribuído sob a forma de grânulos no citoplasma das células germinativas (Kakiuchi *et al*, 2014).

Figura 1 - Obtenção e processamento de amostras do testículo para cultura e criopreservação



Fonte: Elaborado pela autora.

1.3. Congelamento de Tecidos – Testículo

Os resultados dos tratamentos oncológicos de meninos melhoraram consideravelmente nos últimos anos, permitindo que a maioria deles se recupere do câncer. Atualmente, 1 em cada 530 adultos jovens (20-39 anos) é um sobrevivente de um câncer na infância (Ward *et al*, 2014). Devido ao sucesso da oncologia pediátrica, os efeitos colaterais do tratamento são de extrema importância. A infertilidade é um efeito colateral de longo prazo, pois não há meios de preservar a fertilidade antes do tratamento; ao contrário de homens adultos, nos quais a criopreservação de sêmen é realizada. A solução teórica para este problema seria o congelamento e estocagem de tecido testicular previamente à quimioterapia, seguido da

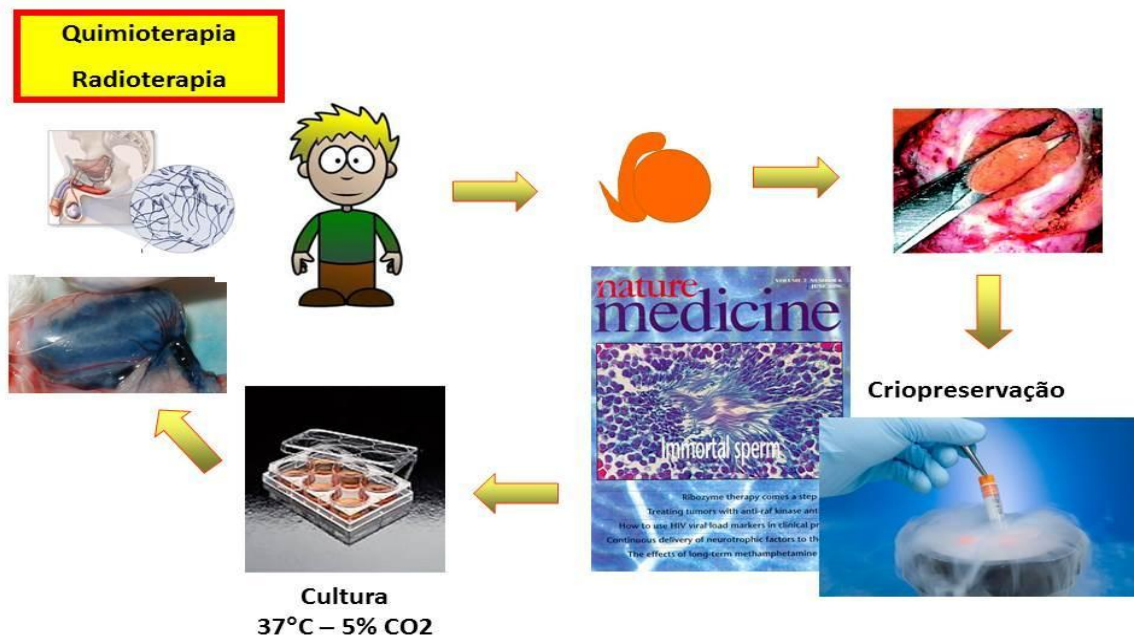
propagação *in vitro* e autotransplante após a cura do câncer (Figura 2). Em 1994, o primeiro transplante de espermatogônias foi realizado em camundongo, com sucesso (Brinster & Zimmermann, 1994). Desde então, o transplante foi realizado em uma variedade de espécies como bovinos, caprinos e primatas (Schlatt *et al*, 2002; Honaramooz *et al*, 2003; Izadyar *et al*, 2003). Além disso, foi demonstrado que células-tronco espermatogoniais de várias espécies (Nagano, McCarrey, Brinster, 2001; Creemers *et al*, 2002; Izadyar *et al*, 2002; Van Pelt *et al*, 2002) e também de humanos (Nagano, Patricio, Brinster, 2002) podem colonizar a membrana basal dos túbulos seminíferos de camundongos imunodeficientes após transplante, tornando possível testar experimentalmente a viabilidade das espermatogônias-tronco.

Como pequenas biópsias testiculares não contêm espermatogônias-tronco em número suficiente para a repopulação do testículo, faz-se necessária a propagação *in vitro* destas células no intuito de se obter quantidades adequadas para o transplante. Estas técnicas de cultura já foram desenvolvidas em animais (Kanatsu-Shinohara *et al*, 2003, 2008; Hamra *et al*, 2005; Aponte *et al*, 2008) e humanos (Sadri-Ardekani *et al*, 2009, 2011).

Até hoje, quatro protocolos de congelamento para tecido testicular foram descritos, usando crioprotetores como 1,5 M de etileno glicol e sacarose (Kvist *et al.*, 2006) e 0,7 M de DMSO (Keros *et al.*, 2005, 2007) ou 0,7 M de DMSO e sacarose (Wyns *et al.*, 2007, 2008; Poels *et al.*, 2014). *Freezers* programáveis não são essenciais para o congelamento de fragmentos de testículo humano (Baert *et al.*, 2013). Trabalhos avaliando o tecido descongelado e transplantado em camundongos *nude* sugerem que a vitrificação pode ser tão eficiente quanto os métodos lentos (Curaba *et al.*, 2011; Poels *et al.*, 2013).

As técnicas experimentais citadas, como o congelamento de tecido testicular e a cultura e propagação *in vitro* de espermatogônias são promissoras, no entanto ainda requerem validação para uso clínico, antes de serem completamente aplicadas na rotina e apresentarem eficiência suficiente para a restauração da fertilidade dos pacientes (Picton *et al*, 2015).

Figura 2 - Esquema representativo de procedimento clínico para a preservação da fertilidade através do congelamento de fragmentos testiculares e transplante autólogo de células-tronco espermatozoniais



Fonte: Elaborado pela autora.

2 JUSTIFICATIVA

A determinação da permissividade ao HIV das células espermatozóides é essencial para melhor compreensão dos mecanismos de disseminação do vírus. Como o SGM é um santuário anatômico onde ocorre a replicação do HIV, e que tanto espermatozóides quanto células germinativas isoladas apresentam receptores alternativos para este vírus, nosso intuito foi utilizar culturas de células testiculares para investigar a interação *in vitro* destas com o HIV, com ênfase na avaliação da infecção em espermatozóides e espermatozóitos primários.

Para tal finalidade, desenvolvemos protocolo de cultura de células testiculares isoladas e sua infecção *in vitro* pelo HIV-1 e várias construções de pseudovírus VSV. Estes experimentos foram realizados no período de setembro de 2013 a agosto de 2014, através de parceria internacional pelo programa de doutorado no exterior modalidade sanduíche (CAPES-PDSE). Os experimentos de infecção célula-célula foram desenvolvidos entre 2015 e 2016. Neste contexto, os mesmos foram realizados no Laboratório de Virologia e Biologia da Reprodução (Irset –Inserm/Institut de Recherche Santé, Environnement e Travail/Institut National de La Santé e de La Recherche Medical U1085), em parceria com a Equipe de Virologia, Química e Reprodução, e em colaboração com os doutores(as) Bernard Jégou, Nathalie Dejuq-Rainsford, Dominique Mahé, Giulia Matusali e Anne Pascale-Satie na Universidade de Rennes 1. O Laboratório de Biossegurança Nível 3 utilizado para os experimentos de infecção pertence ao Biosit (Estrutura Federativa para Pesquisa em Biologia), dirigido pelo Dr. Thierry Guilladeaux, assim como os laboratórios de Microscopia Confocal e de Imunofluorescência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

a) Determinar a capacidade de interação entre as células testiculares da linhagem germinativa e o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

3.2 Objetivos específicos

a) Estabelecer um protocolo de isolamento e cultivo primário de células germinativas humanas para experimentos *in vitro* de infecção pelo HIV e pseudovírus VSV.

b) Caracterizar as células germinativas obtidas de testículo humano e cultivadas *in vitro* por meio de marcadores moleculares.

c) Estabelecer um protocolo de criopreservação de fragmentos testiculares e células após isolamento e células cultivadas.

d) Desenvolver protocolo de infecção pelo HIV (diferentes cepas), e pseudo VSV em células da linhagem TCam-2.

e) Estudar a natureza das interações entre as células germinativas testiculares e TCam-2 e o HIV, para se determinar a capacidade destas células em abrigar este vírus e identificar os fatores celulares e virais envolvidos nestas interações.

f) Explorar as primeiras etapas da replicação viral em cultura de células germinativas.

g) Confirmar ou invalidar a hipótese da integração do genoma do vírus HIV nas células germinativas humanas e células TCam-2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi executado no Laboratório de Biologia Celular do ICB-UFMG e no Laboratório de Virologia e Biologia da Reprodução [Irset -Inserm (Institut de Recherche Santé, Environnement et Travail - Institut National de La Santé et de La Recherche Medicale, U1085)], da Universidade de Rennes 1, França.

As amostras testiculares foram obtidas de biópsias e orquiectomias realizadas de pacientes portadores de câncer de próstata, através de colaboração com a equipe de urologia do Hospital Pontchaillou, Rennes, França, declaração CCPPRB n°02/31-407 ou orquiectomias *post-mortem* (Hospital Pontchaillou, Rennes, declaração da Agência de Biomedicina n° PF S09-015). No Brasil foi também obtido material doado por pacientes submetidos a técnicas de reprodução assistida e orquiectomia terapêutica. Todos estes experimentos têm parecer favorável do COEP - Comitê de Ética em pesquisa da UFMG (No. CAAE – 11518812.6.000.5149).

4.1 Desenvolvimento de protocolo de cultivo primário de células germinativas testiculares

Este protocolo foi padronizado e desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do ICB-UFMG com amostras de testículos de pacientes não portadores do HIV e submetidos a procedimentos de biópsia testicular diagnóstica ou biópsia para procedimentos de Reprodução Assistida (TESE/TESA – Testicular Sperm Extraction/Testicular Sperm Aspiration); bem como à orquiectomia unilateral ou bilateral terapêutica para tratamento de câncer de próstata ou de testículo.

O protocolo de cultivo primário de células germinativas humanas foi padronizado, com ligeiras modificações, baseado em estudos pioneiros de Kanatsu-Shinohara e colaboradores (2003) e Sadri-Ardekani e colaboradores (2011). O protocolo original, juntamente com suas modificações e atualizações, foi obtido diretamente da Dra. Ans Van Pelt, em treinamento realizado pela doutoranda em seu laboratório, no Centro Médico da Universidade de Amsterdam.

Com a finalidade de se preparar as suspensões celulares para a obtenção de células germinativas, os fragmentos testiculares humanos (n=23, fresco ou criopreservado, Anexo I, Tabela 1) foram submetidos à digestão enzimática com o uso de hialuronidase, DNase, colagenase e tripsina. Após plaqueamento diferencial *overnight* a fração sobrenadante, rica

em células germinativas, foi cultivada em meio de cultura StemPro (InVitrogen) suplementado (Anexo II) e na presença dos fatores de crescimento GDNF, FGF, EGF, LIF, e também dos hormônios estradiol e progesterona. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e as células repicadas com o uso de tripsina uma vez por semana. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e/ou cultivadas sobre lamínulas de vidro cobertas com laminina (20µg/mL), fixadas com paraformaldeído a 4% e submetidas à técnicas de imunocitoquímica. Foram utilizados anticorpos para a identificação das seguintes proteínas: VASA, SSEA4, MAGEA4, STRA8, GRFA1, THY1, HLA1. O material foi analisado através de microscopia de fluorescência e confocal.

Para as análises histológica, morfométrica e imunohistoquímica, um pequeno fragmento de cada amostra foi fixado em paraformaldeído a 4% e Bouin e incluído em parafina.

4.2. Extração de Células Germinativas de testículo humano pós-orquiectomia

Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis. Feita a dissecação da albugínea, foram obtidos fragmentos de 1 a 2 mm do parênquima testicular. Porções cauterizadas e de tecido conjuntivo denso foram desprezadas.

As amostras foram examinadas a fresco para a identificação de espermatozoides e preenchimento dos túbulos seminíferos, o que servia para confirmar a ocorrência de espermatogênese completa. Dez gramas de parênquima testicular foram utilizados para os experimentos a fresco, sendo que o material restante foi congelado.

4.2.1 Isolamento das células germinativas e início da cultura

Os fragmentos obtidos foram submetidos à dissociação enzimática, sendo as concentrações finais de cada uma das enzimas utilizadas detalhadas conforme segue: hialuronidase, 20mg/mL (Sigma-Aldrich); collagenase, 10mg/mL (Sigma-Aldrich); DNase, 4mg/mL (Sigma-Aldrich).

Os fragmentos foram deixados suspensos nesta solução por uma hora, à temperatura de 37°C sob agitação. Caso a preparação se mostrava viscosa, mais DNase era adicionada (~300uL). Após a ação enzimática, o material foi centrifugado por 9 minutos a 1800 rpm. O **sobrenadante** foi desprezado. Ao *pellet* resultante foi adicionado 25mL de tripsina (Sigma-Aldrich) por 20 minutos, à temperatura de 37°C. A ação da tripsina foi inativada com

soro fetal bovino a 10% do volume total. A solução foi filtrada em filtro de 60µm. O filtrado obtido foi lavado duas vezes com meio de cultura DMEM/F12, a 1500 rpm por 5 minutos. A terceira lavagem foi realizada com o meio de cultura DMEM/ F12 suplementado e as células diluídas para uma concentração final de 0,2-0,5 x 10⁶/ml num total de 24 mL de meio de cultura. Este volume foi repartido em duas garrafas de cultura médias com 12 mL em cada. A concentração de células foi calculada através de contagem com a câmara de Malassez e a viabilidade celular foi determinada pela técnica de exclusão azul de tripan.

As suspensões celulares obtidas foram cultivadas *overnight* a 37° C e atmosfera de 5% CO₂ em meio DMEM/F12 suplementado com aminoácidos não essenciais, 4 mM de L-glutamina, 40 µg/mL de gentamicina, 15 mM de HEPES, bicarbonato de sódio 0,12%, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 ug/mL) e soro fetal bovino a 10%. Após incubação, as células em suspensão foram recolhidas e cultivadas a uma densidade de 10.000 a 20.000 células/cm² em placas não revestidas em meio de cultivo StemPro-34 (Invitrogen), suplementado com penicilina/estreptomicina 0,5% (Invitrogen), fator de crescimento epidérmico (EGF) de rato, EGF humano recombinante (20 ng/mL) (Sigma-Aldrich), GDNF recombinante (10 ng/mL) (Sigma-Aldrich), LIF humano (10 ng/mL) (Chemicon International Inc) (ver Anexo II). As células foram cultivadas em placas de cultura não revestidas de 6 poços (Falcon) a 37°C, em atmosfera umidificada, com CO₂ a 5%, e repicadas com tripsina EDTA (0,25%) (Invitrogen) a cada 7 a 10 dias para uma ou várias novas placas, após estarem com 80-90% de confluência.

4.2.2 Congelamento

As células obtidas após isolamento ou os fragmentos do testículo foram criopreservados com uma solução crioprotetora contendo 8% DMSO e 20% soro fetal bovino em PBS. Após equilíbrio de 30 minutos a 4°C, criotubos de 2 mL foram colocados na caixa de congelamento CoolCell e acondicionados num *freezer* à temperatura de -80°C *overnight*. Após este período, o material foi transferido para o nitrogênio líquido (-196°C).

4.2.3 Descongelamento

Os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e deixados a descongelar fechados à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, os criotubos foram desinfetados com álcool 70°. No caso das células, estas eram lavadas em meio de cultura e colocadas em cultivo. Os

fragmentos descongelados foram lavados em concentrações decrescentes de DMSO e submetidos à digestão enzimática com o uso de hialuronidase, DNase, colagenase e tripsina para isolamento das células germinativas a serem cultivadas, seguindo os mesmos procedimentos descritos para o tecido fresco.

4.3. Infecção das células TCam-2, Jurkat e PBMC

As células TCam-2 pertencem a uma linhagem celular derivada de seminoma, que é um tumor germinativo testicular (Mizuno *et al.*, 1993; De Jong *et al.*, 2008). Estas células são tetraplóides (90 cromossomos) e perderam o cromossomo Y. Elas não expressam o CD4, entretanto estão presentes nestas células o heparam sulfato, o receptor de manose, o GalCer, o CCR3, CCR5 e CXCR4, todos receptores alternativos para o HIV.

Como células-alvo permissivas para os controles positivos da infecção foram utilizadas as células Jurkat, uma linhagem de linfócitos T CD4+ CXCR4+ modificadas para expressar o CCR5 de maneira estável e PMBC humanos doados após aférese (CHU, Hospital Pontchaillou, Rennes). Estas linhagens foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Falcon) à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) completo, com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich), glutamina à 2mM (Sigma Aldrich) e os antibióticos penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich).

As células Jurkat foram cultivadas em suspensão e foram diluídas em meio de cultura a fresco. O agente de seleção geneticina (G418; Sigma Aldrich) foi adicionado ao meio de cultura a uma concentração de 1mg/mL com a finalidade de estabilizar estas células geneticamente modificadas.

As células TCam-2 são aderentes, de modo que ao atingirem a confluência total foram tripsinizadas (Tripsina 0,5g/L + EDTA 0,2 g/L, Sigma Aldrich) por 4 minutos à 37°C, e depois diluídas em meio fresco, e finalmente depositadas numa nova garrafa (ou utilizadas para os experimentos). Os PMBCs foram obtidos a fresco e utilizados no mesmo dia. As células foram marcadas previamente à infecção com o corante fluorescente CFSE (CellTrace, Life Technologies), excitável com laser 488nm.

4.3.1. Cepas de vírus e pseudovírus utilizadas

São descritas diferentes cepas de HIV, de acordo com os co-receptores que utilizam, conforme segue: as cepas que utilizam o co-receptor CXCR4 (tipicamente expresso pelos linfócitos T) são chamados vírus X4, ou linfotrópicos; enquanto as cepas que utilizam os

co-receptores CCR5, expresso pelos macrófagos e linfócitos T de memória, são definidas como R5, ou macrófago-trópicos. Algumas cepas podem utilizar os dois tipos de receptores, sendo então chamadas R5X4, ou duo-trópicas (O' Brien *et al.*, 1994).

Nos experimentos realizados no presente estudo foram utilizadas cepas virais de HIV-1 de tropismo R5 (SF162, JR-CSF, Bal, ARP1114 e GFPVPR) e de tropismo X4 (IIIb, Ad8 e pnl4.3). Estes vírus foram produzidos através de infecção *in vitro* de PBMCs.

Lentivírus pseudotipados não infecciosos foram construídos a partir de envelopes virais do HIV-1 (SF162, tropismo R5; ou HxB2, tropismo X4) ou do envelope do VSV (Vírus da estomatite Vesicular) através de transfecção nas células 293T. Estes pseudovírus carregam genoma viral que apresenta as sequências mínimas necessárias para a encapsidação, transcrição reversa e integração. No entanto, a região da LTR (promotor viral) está inativada para a transcrição após a integração, determinando o caráter não-infeccioso destes pseudovírus. Adicionalmente, o genoma destes vírus pseudotipados apresenta um gene que resulta na expressão da proteína fluorescente verde (GFP) após a infecção.

As partículas virais assim obtidas foram dosadas para p24 por ELISA, ultracentrifugadas (100.000 g/30 minutos), concentradas e tratadas durante 30 minutos a 37°C com Benzonase diluída 10x (Sigma Aldrich) para eliminar DNA e RNA restantes em solução.

As células foram analisadas em diferentes condições para:

- a) entrada viral, através de imunofluorescência para p24;
- b) síntese de DNA viral e integração (qPCR/Detecção da GFP por FACS) e
- c) por produção viral (ELISA).

4.3.2 Procedimento das Infecções das culturas celulares

As células TCam-2 foram colocadas em placas de 6 poços, à concentração de $0,5 \times 10^6$ células /poço e os PBMC e Jurkat em placas de 24 poços à concentração de 2×10^6 células/poço. As células foram infectadas com 200ng equivalente em p24 de pseudovírus ou vírus anteriormente descritos por milhão de células, através de centrifugação durante 90 minutos a 2500 rpm em presença de polibreno (8ng/mL; Sigma-Aldrich), que é um agente catiônico que favorece o contato do vírus com as células.

A infecção foi realizada com ou sem nevirapina, um inibitor da transcriptase reversa, utilizado à concentração 30µM final. A infecção foi também realizada na presença ou ausência do raltegravir, que é um inibidor de integrase da nova classe de drogas

antirretrovirais que atua impedindo o HIV de integrar seu DNA nas células humanas.

A cloroquina é um agente lisosomotrópico que impede a acidificação dos endossomos, por acúmulo nas partes acídicas das células (endossomos, lisossomos). Seu modo de ação é inibir enzimas lisossômicas que atuam em pH ácido, impedindo a fusão dos endossomos. A cloroquina tem impacto na entrada de HIV-1 e VSV-G mediada por endocitose, protegendo as partículas virais da degradação nos endossomos e também inibindo a acidificação endossômica necessária para a fusão destas partículas. A cloroquina foi utilizada à concentração de 10 μ M por 4 horas, em associação à centrifugação (*Spin infection*) por 1h 30min. Foi realizada a detecção da p24 através de imunofluorescência 4h após a infecção.

O meio de cultura utilizado na infecção foi substituído por meio fresco e as células colocadas em cultura no meio RPMI completo. Após os períodos *overnight* ou 48 horas de incubação, a 37° C, 5% de CO₂, as células foram lavadas 2X em PBS e os *pellets* congelados a seco a -80°C. Estes *pellets* foram utilizados para a extração do DNA com auxílio do QIAamp DNA Blood Mini Kit 250 (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, o DNA foi dosado em NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) e a concentração ajustada para 100ng/ μ L.

4.4 A pesquisa do DNA viral por PCR quantitativo (qPCR)

O princípio da qPCR permite a quantificação do DNA amplificado por detecção de fluorescência (sistema FAM-TAMRA). A quantidade de fluorescência detectada é proporcional à quantidade de DNA amplificado. A utilização de gama de calibração permite obter a quantidade inicial contida nas amostras. Nestes experimentos, uma gama foi realizada a partir de DNA obtido de células 8E5, que apresentam uma cópia de DNA integrado por célula. Para a quantificação do DNA viral dois elementos foram amplificados em paralelo, uma sequência situada no genoma do HIV-1 e uma do gene da albumina, que foi utilizado para normalizar as quantidades de DNA medidas.

Cada reação de PCR foi realizada num volume de 20 μ L composto de: 10 μ L de Master mix 2X (Applied Biosystems); 0,4 μ L de primer senso à 25 μ M; 0,4 μ L de primer anti-senso à 25 μ M; 0,4 μ L de sonda à 10 μ M; 3,8 μ L de água estéril; e 5 μ L de matriz DNA à 100ng/ μ l para as TCam-2 ou à 20ng/ μ l para os PBMC/Jurkat. A reação de PCR foi realizada em placa de 96 poços.

A amplificação foi realizada num termociclador (7500 Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial de 10 minutos à 95°C, seguida de 40 ciclos, de

modo que para cada ciclo foi observada uma etapa de desnaturação (15 segundos à 95°C) e depois de alongamento (1min à 60°C). Os resultados do PCR foram analisados com o auxílio do programa 7500 Software (Applied Biosystems).

4.5. Detecção por citometria de fluxo

Com a finalidade de se avaliar a infecção pelos pseudovírus nas células Jurkat, PMBC e TCam-2 foi utilizada a detecção da emissão da fluorescência GFP.

Esta técnica foi também utilizada para a avaliação da natureza das células testiculares após dissociação. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-HLA-ABC (BD Pharmingen, clone G46-2.6 conjugado com PE) anti-Vimentin (Epitomics, clone EPR3776), anti-DDX4 (Abcam, Rabbit polyclonal), anti-SSEA-4 (BD Pharmigen, clone MC81370, conjugado com FITC); GRF α -1 (ab176564), THY-1(CD-90.1 PE Miltenyi Biotec ref.130-094-528).

Para a detecção de moléculas de superfície as células foram o em gelo por 30 minutos com o anticorpo específico ou isotipo controle e depois lavadas e quando necessário, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo. Para detecção de proteínas intracelulares as células foram permeabilizadas ((BD cytofix/cytoperm) e submetidas à marcação com o anticorpo à temperatura ambiente.

Foi utilizado o citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) e o *software* CELLQuestPro para a aquisição e análise.

4.6 Infecção das culturas primárias de células testiculares (vírus livre)

As células germinativas obtidas após plaqueamento diferencial *overnight* foram colocadas em placas de 24 poços, à concentração de $0,5 \times 10^6$ por poço, sobre lamínulas de vidro cobertas com laminina, que favorece a adesão das células-tronco.

As células foram infectadas com $20\text{ng}/10^5$ equivalente em p24 de pseudovírus ou vírus anteriormente descritos por milhão de células, através de centrifugação durante 90 minutos a 2500 rpm em presença de polibreno. O meio de cultura utilizado foi o StemPro suplementado com os fatores de crescimento GDNF, EGF, FGF2, LIF. Após diferentes períodos de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as células foram lavadas 2 X em PBS e fixadas diretamente sobre as lamínulas, com paraformaldeído a 4% por 20 minutos. As células foram lavadas em PBS, deixadas a secar ao ar, e congeladas a -20°C.

4.7. Infecções das culturas primárias de células testiculares (célula-célula)

Para as infecções célula-célula foram utilizadas as células Jurkat (linhagem de linfócitos modificados) infectados com HIV-1 cepas AD8 e pnl4.3. PBMC humanos obtidos após aférese foram também utilizados. Estas células foram infectadas com o vírus cepa R5 ARP1114. As células germinativas foram marcadas com *Cell Tracer* e submetidas à infecção por um período *overnight* e marcadas com VASA e p24 para imunofluorescência. As imagens foram obtidas em microscopia confocal (Leica, SP8) e analisadas com o *software* ImageJ (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.8. Imunocitoquímica e imunohistoquímica

As lamínulas foram descongeladas e rehidratadas por 30 min em PBS. Em seguida, foram incubadas numa solução de glicina 0,3M em 1% BSA; 0,05% Triton-X 100, por 30 min à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em PBS, foi feita a incubação com o anticorpo primário, diluído em PBS + 1% BSA, por 1 hora. Após este procedimento, foi feita a incubação com o respectivo anticorpo secundário, um Alexa fluorescente (diluição 1:500), por uma hora. Os seguintes anticorpos foram utilizados: VASA (DDX4 – Abcam), diluição 1:400, secundário Alexa 488, isotipo IgG coelho diluição 1:70; MAGE-A4, diluição 1:20, Clone B57 (20ug/ml), secundário alexa 594, isotipo IgG1 (500ug/ml) 1:500; Stra8 1:250 (Abcam), secundário Alexa 594, isotipo IgG coelho 1:25; p24 (NIH 183 5mg/ml, p27), diluição 1:500, secundário Alexa 594, isotipo IgG1K; SSEA-4 (Santa Cruz) 1:25, secundário Alexa 594, isotipo IgG3kFITC 1:2000; HLAABC (MHC-1, Abcam) 1:100, secundário Alexa 488, isotipo IgG2 camundongo.

Para a imunohistoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos: Sox9 (Santa Cruz sc-20095) 1:100, secundário Estreptavidina-Biotina Peroxidase, isotipo IgG1 camundongo; α -SMA (Dako M0851) 1:50, isotipo IgG2a, secundário Estreptavidina-Biotina Peroxidase; MKI67 (BD Pharmingen 550609) 1:500, secundário Estreptavidina-Biotina Peroxidase, isotipo IgG1K.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas mais 3x com PBS. O núcleo foi corado com DRAQ5 diluído 1000x em PBS, por 5 min à 37°C. As lamínulas foram montadas com Prolong (Antifade kit, Invitrogen, P7481). A leitura e análise das mesmas foi realizada com o

auxílio de microscópios de fluorescência e confocal e as imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do Programa ImageJ.

Para o tecido fixado em paraformaldeído e incluído em parafina foram obtidas secções de 5 µm que foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada por ebulição em microondas em uma solução de 10 mM de citrato de sódio (pH 6,0) por 15 minutos. Os cortes foram lavados em solução tampão TRIS 0,05M (TBS), pH 7,6, e então coradas usando-se o método indireto da streptavidina-biotina peroxidase. Resumidamente os cortes foram incubados por 5 minutos em H₂O₂ a 3% (Sigma Aldrich) para bloquear peroxidase endógena, lavadas em TBS, e incubadas 2X por 10 minutos em TBS suplementado com 1% de albumina bovina (BSA) para bloquear sítios não-específicos. Os cortes foram então incubados *overnight* a 4°C. com os respectivos anticorpos primários. Em seguida, após duas lavagens em TBS, os cortes foram expostos ao anticorpo secundário biotilado por uma hora a temperatura ambiente. A detecção da coloração marrom foi realizada pela incubação dos cortes com a estreptavidina por 10 minutos, seguida pela reação com o substrato da peroxidase 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich) e contracolorados com a Hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas e analisadas por microscopia de luz.

4.9. Contagem diferencial

Para determinar o percentual de células VASA-positivas e MAGE-A4 – positivas foi realizada a contagem diferencial (núcleo de célula marcada x 100/300 núcleos). Esta análise foi realizada no T1 (Dia 1 de cultivo), T12 (dia 12) e T23 (dia 23).

4.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o teste t independente e pela análise de variância ANOVA *one-way*. Comparações múltiplas foram realizadas pelo teste Bonferroni *post hoc*. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Todos os cálculos foram realizados com o *software* SPSS para Windows v11.5 (Chicago, Illinois, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da cultura primária de células testiculares

5.1.1 Progressão das células testiculares adultas em cultura

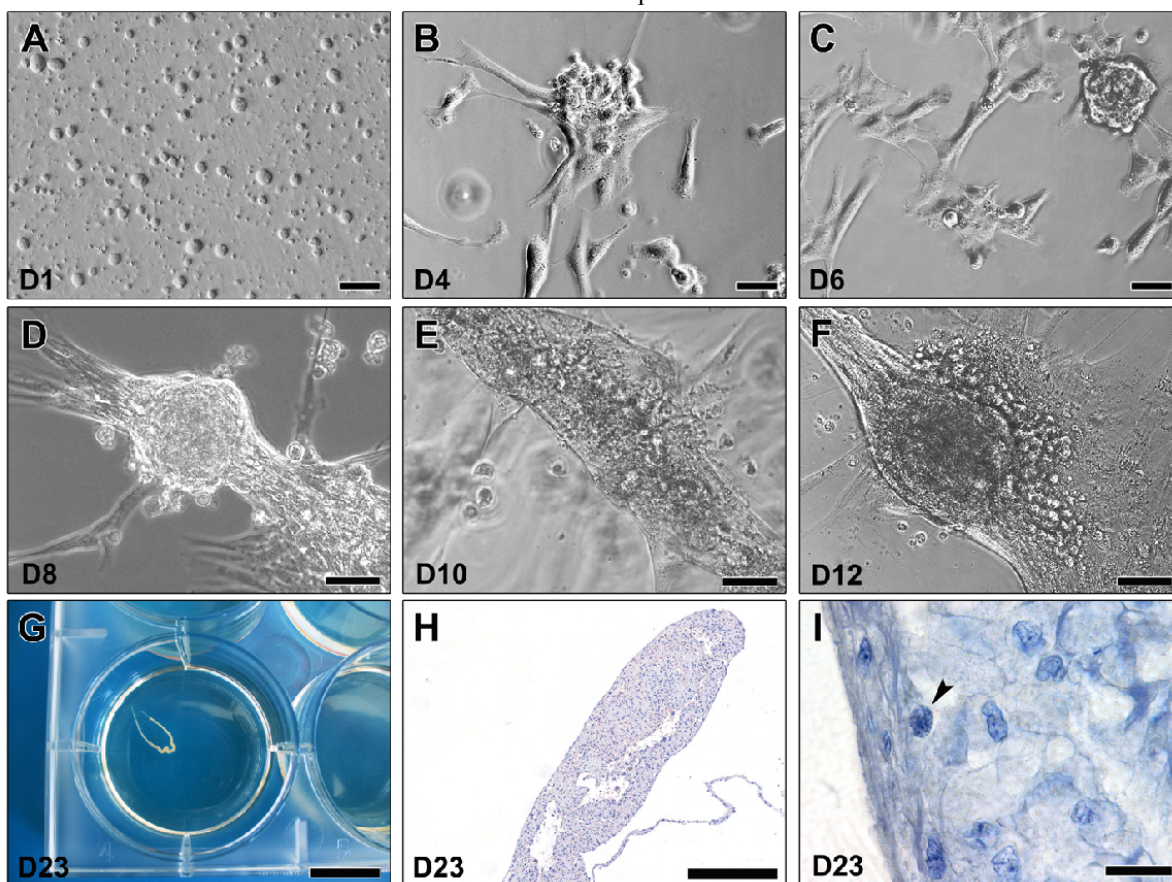
Após dissociação das células testiculares foi obtida uma suspensão de células individualizadas (Fig. 3 A). No dia 4 de cultivo foram observados aglomerados celulares em algumas áreas da placa de cultura (Fig. 3 B). O grau de complexidade destes agregados foi aumentando a medida que a cultura se desenvolvia (Fig. 3 B – F). Os agregados apresentaram forma esférica (Fig. 3 C and D), alongada (Fig. 3 E) ou oval (Fig. 3 F). Extensões citoplasmáticas de células somáticas na periferia das colônias estavam em contato com células isoladas e aglomerados celulares. Células menores, arredondadas, foram vistas em pares ou em grupos, apresentando associação com uma trama celular ou repousando no topo das colônias. Algumas das colônias deram origem a estruturas em cordão de até 30 mm de comprimento e 1 mm de largura (Fig. 3 G). O aspecto macroscópico do cordão foi de um filamento compacto, que se apresentava contorcido ou retilíneo. A microscopia ótica mostrou um perfil alongado bem organizado (Fig. 3 H). As células testicularem em cultura foram capazes de recapitular o padrão de formação do túbulo seminífero (Fig. 3 I).

5.1.2 Caracterização das células testiculares em cultura

A avaliação da suspensão celular obtida após a digestão testicular revelou células VASA+, MAGEA4+, STRA8+ e SSEA4+ (Fig. 4 A - L). Todos os controles com os isotipos foram negativos. A frequência de células positivas para VASA, MAGEA4, SSEA4, GRFA1, CD-90 e HLAABC na suspensão celular foi avaliada por FACS e por contagem diferencial em microscopia ótica (Fig. 4 M – N).

Figura 3 - Progressão das células testiculares humanas em cultivo do dia 1 ao dia 23 resultando na formação *in vitro* de organoide alongado

Fonte: Elaborado pela autora.



Legenda:

- Microscopia de contraste de fase de células cultivadas em placas de 6 poços nos dias 1 a 12 (A-F).
- Observar no dia 1 células isoladas em suspensão na placa de cultura (A).
- Aglomerados de células foram observados desde o dia 4 (B)
- e o nível de organização se torna mais complexo nos dias subsequentes até o 12º. dia de cultura (C, D, E F).
- Macroscopicamente, uma estrutura filamentososa derivada dos agregados celulares foi observada no dia 23, resultando na formação de um organoide (G).
- Microscopia ótica foi utilizada para avaliar a organização geral do cordão formado *in vitro*. Em (I), observa-se a citoarquitetura de um epitélio seminífero rudimentar, onde é observada uma célula germinativa (seta) em associação à membrana basal. Barras de escala: A = 100µm; B – F = 50µm; G = 1.5cm; H = 500µm; I = 24µm.

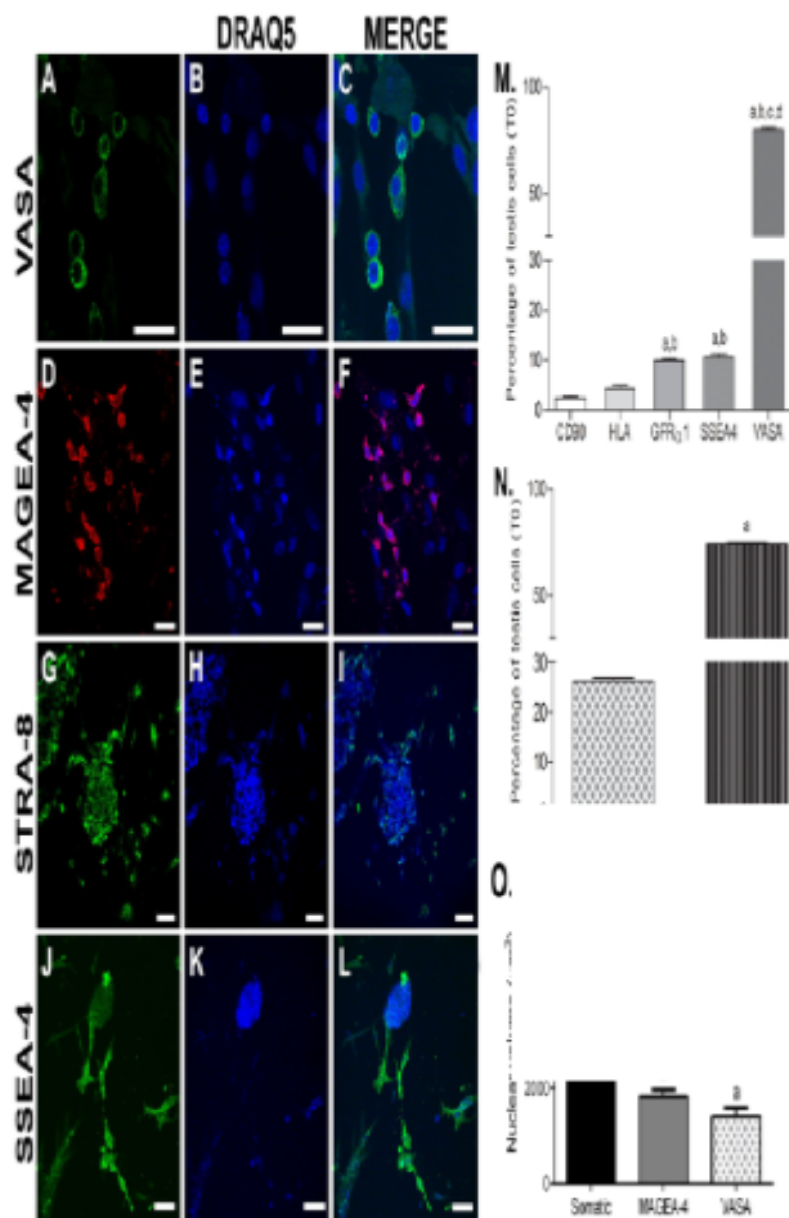
Desta forma, células VASA+ foram aproximadamente 75% das células presentes na

suspensão inicial (Fig. 4 M – N), seguidas de 26% de células MAGEA4+ (Fig. 4 N). Os percentuais de células positivas para GFRA1 and SSEA4 foram respectivamente $9,9 \pm 0,3$ e $10,7 \pm 0,7$ (Fig. 4 M). THY1 (CD-90), um marcador de superfície presente em uma subpopulação de células-tronco espermatogoniais foi expresso por uma fração menor das células isoladas, em torno de 2% (Fig. 4 M). Assim, a maioria das células presentes na suspensão celular após a digestão enzimática com plaqueamento *overnight* eram células germinativas, uma vez que células somáticas HLAABC+ correspondiam a 4% do total (Fig. 4 M).

Também foi comparado o percentual de células positivas para VASA e MAGEA4 do primeiro dia de cultura (T1) até o dia 23 (T23) através de contagem celular diferencial. Foi observado um decréscimo significativo na quantidade de células VASA+ observadas entre o dia 1 (42%) e 8 (14%) seguido por uma redução menor no número de células até o final (T23; 2%) (Fig. 5 A). Embora uma redução tenha sido observada do dia 1 ao 23 (59%, Fig. 5 B), diferentemente das células VASA, quase 11% das células germinativas restantes no T23 eram MAGEA4+.

Para estabelecer a proporção de células germinativas versus células somáticas, avaliamos o percentual de células SSEA4 e HLAABC nos dias 1 e 23 da cultura. Corroborando nossos achados anteriores, no dia 1 detectamos 11% de células SSEA4+ e 4% de células HLAABC+ (Fig. 5 C). No dia 23, observamos um padrão invertido, uma vez que o número de células SSEA4+ tinha reduzido significativamente (3%) e o número de células somáticas HLAABC+ havia aumentado (72%) (Fig. 5 C).

Figura 4 - Caracterização das culturas primárias de células testiculares usando-se microscopia confocal e citometria de fluxo



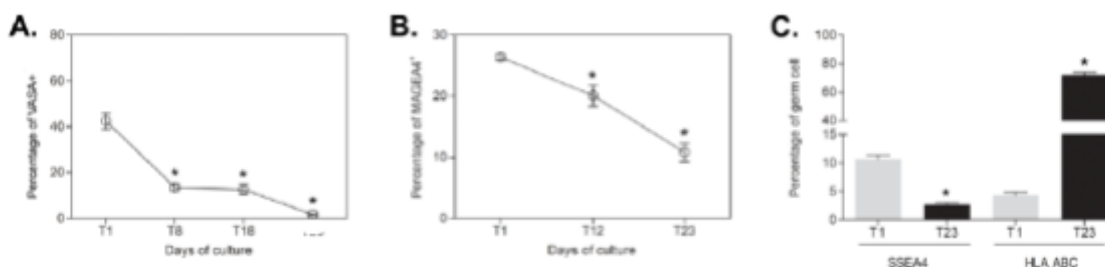
Fonte:

Elaborado pela autora.

Legenda:

- A imunofluorescência foi realizada para avaliar a presença de células germinativas nos dias 12 e 23 de cultivo.
- Assim, células positivas para VASA (A - C) e MAGEA4 (D - F) foram observadas no dia 12. No 23º dia de cultura, agregados de células positivas para STRA8 (G - I) e SSEA-4 (J - L) foram identificados. Células somáticas estavam presentes nas culturas após plaqueamento *overnight* como revelado pelo percentual de células HLAABC+ (M). Note que a frequência de células VASA+ foi maior que os outros fenótipos (M, N). Barras: A - F = 50µm; G - L = 100µm.

Figura 5 - Culturas primárias de células testiculares mantidas até 23 dias



Fonte: Elaborado pela autora.

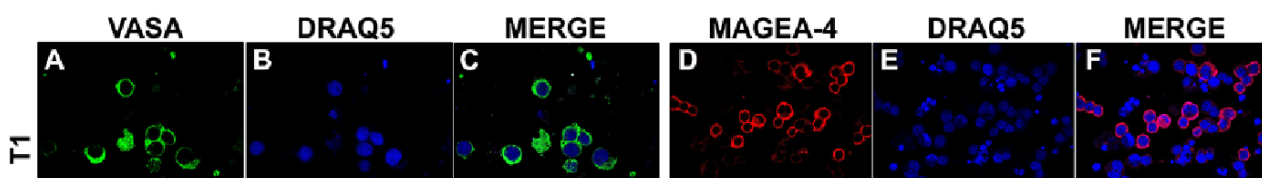
Legenda:

- Notar que após a primeira passagem (T1), os percentuais de células germinativas VASA+ (A), MAGEA4+ (B) and SSEA4+ (C) foram maiores que os obtidos aos 23 dias de cultura. Inversamente, o percentual de células HLAABC+ aumentou até o final da cultura (C).
- A e B: contagem diferencial
- C: citometria de fluxo.

5.1.3 Diferenciação e reorganização de células testiculares adultas em cultura

O arranjo entre as células somáticas e germinativas em cultura foi acompanhado por análise em imunofluorescência. Foram observadas modificações quanto a organização das culturas do dia 1 ao 12. A população inicial (Fig. 6, T1; A, B, C; D, E, F) era composta tanto por células positivas quanto negativas para ambos os marcadores VASA e MAGEA4. As células foram observadas principalmente isoladas mas também formando grupos de 2-4 células. A forma das mesmas era arredondada. Por volta do dia 12 (T12) foi possível identificar grupos de células VASA+ (Fig. 6; G, H, I) e MAGEA4+ (Fig. 6; J, K, L) alinhadas. No 23º dia (T23), foi observado que a cultura havia sofrido modificações significativas quanto ao padrão de organização. Células VASA+ poderiam ser observadas dentro dos aglomerados (*clusters*) (Fig. 6, T23; M, N, O). As células se destacaram do fundo da placa e, enrolando-se sobre si mesmas, produziram uma estrutura semelhante a um cordão, conforme pode ser observado na Fig. 2 G. No interior destes cordões foram observadas numerosas camadas de células somáticas e células germinativas MAGEA4+ (Fig. 6 P, Q) as quais estavam circundadas por uma camada externa de células somáticas alongadas.

Figura 6 - Desenvolvimento de organoides a partir de células testiculares em cultivo primário ao longo de 23 dias



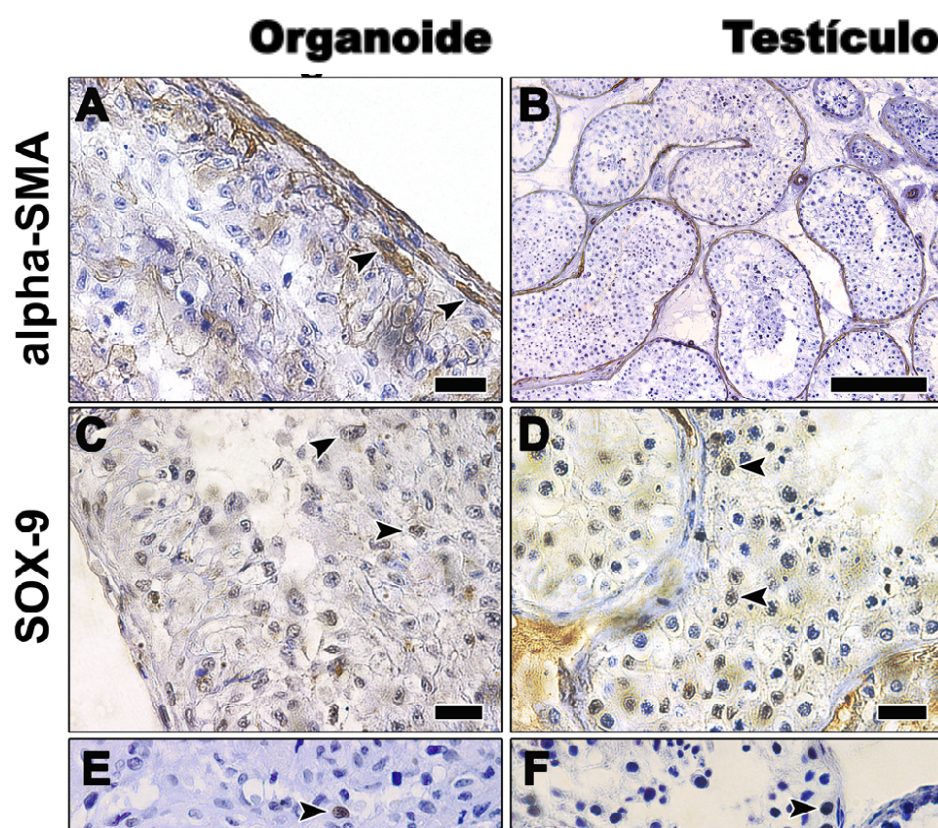
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda:

- Observa-se a presença de células VASA+ (A – C; G – H; M – O) e MAGEA4+ (D – F; J – L; P – Q) desde a primeira passagem (T1), tempo intermediário em cultura (T12) e final da cultura (T23).
- A – O, Imunofluorescência.
- P – Q, Imunoperoxidase.
- Barras: A – P = 50µm; Q = 25µm. DRAQ5, marcação nuclear.

No intuito de caracterizar diferentes populações celulares nos organoides testiculares recuperados no 23º dia de cultura, realizamos um ensaio de imunoperoxidase. Desta forma, mostramos que estas células circundando os túbulos eram positivas para α -SMA, no mesmo padrão observado nos testículos controle (Fig. 7 A e B). Também avaliamos a expressão de uma proteína específica de células de Sertoli, SOX9. Assim, mostramos que células somáticas de ambos os tecidos foram positivas para este marcador (Fig. 7 C e D). Além disso, células no interior dos organoides testiculares ainda eram capazes de proliferar, como demonstrado pela imunomarcação para o MKI67 (Fig. 7 E F). Outros tipos celulares, que podem incluir células endoteliais, fibroblastos, linfócitos, macrófagos e células dendríticas não foram caracterizados em nossos estudos.

Figura 7 - Imunohistoquímica dos organoides testiculares formados *in vitro* após cultivo primário de células testiculares



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda:

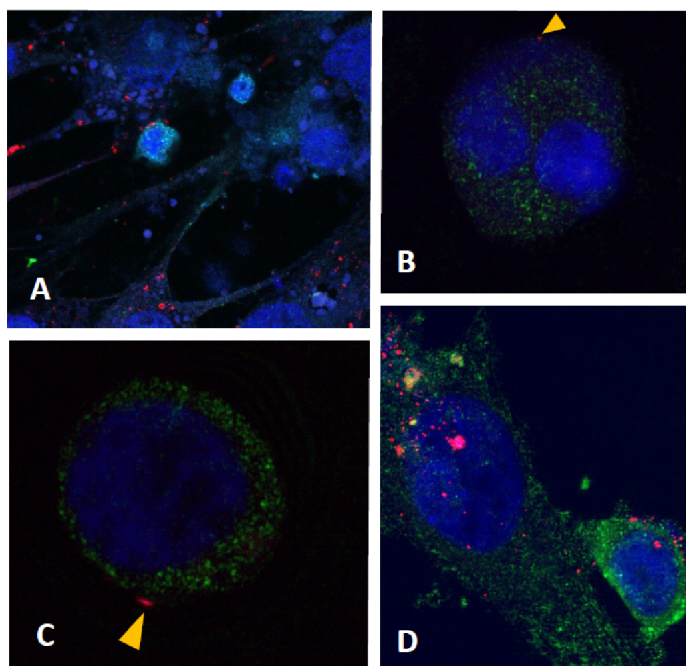
- Observa-se em **(A)**, células α -SMA+ (seta) presentes na camada mais externa dos túbulos seminíferos formados “*de novo*”, com mesmo padrão observado para células peritubulares mioides associadas à membrana basal nos túbulos seminíferos controle **(B)**.
- A presença de células de Sertoli nos organoides testiculares foi confirmada com a marcação pelo SOX9 **(C, seta)**. Células SOX9 também foram observadas no testículo adulto **(D, seta)**.
- Células em proliferação foram observadas nos organoides (setas) como foi demonstrado pela marcação para MKI67 **(E)**. Em **(F)**, espermátócitos primários positivos para o marcador MKI67 (seta).
- Barras: A, C – F = 25 μ m; B = 100 μ m.

5.2 Infecção de células germinativas em cultivo primário pelo HIV

Nestes experimentos, as células em cultura foram analisadas em diferentes tempos, utilizando-se a detecção através de anticorpos contra o capsídeo viral HIV p24 e VASA.

Tanto as células somáticas quanto as células germinativas (VASA+), apresentaram marcação para o p24. Assim, nas células somáticas que formavam a camada aderida à lamínula foi observada marcação abundante (pontos vermelhos), localizada na membrana e citoplasma (Fig. 8 A). Nas células germinativas foram observados pequenos e escassos pontos, os quais foram visíveis somente por meio de microscopia confocal em grandes aumentos e fazendo-se o escaneamento completo das lâminas (Fig.8 B-C, Fig. 9 e 10 B, C). Células germinativas apresentando sinal p24 estavam associadas às células somáticas (Fig. 8 A e D). Foi possível sugerir a internalização das partículas p24 através do estudo de secções seriadas obtidas com microscopia confocal (Fig. 10 A - C). A marcação com o p24 foi também detectada em células VASA+ encontradas isoladas (Fig. 9 e 10 B, C).

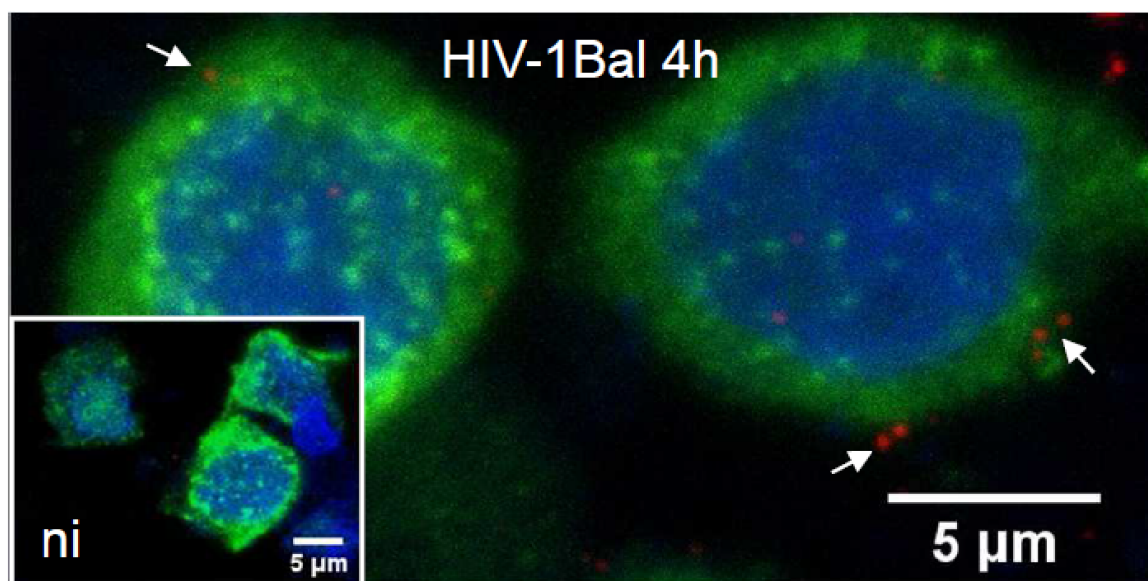
Figura 8 - Cultivo primário de células testiculares (18º dia de cultura) HIV-1/Bal, 16h após infecção



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os pontos vermelhos representam marcação para p24/Alexa 594, enquanto células VASA+/Alexa 488 foram mostradas em verde. Em (A), nota-se p24 na camada de células somáticas. Em (B), células germinativas em divisão, com marcação p24 aparentemente superficial foram observadas. Por outro lado, célula germinativa de perfil esférico com sinal p24 na superfície está representada em (C). Note em (D) célula germinativa apoiada em célula somática e vários pontos vermelhos (p24) associados a estas células.

Figura 9 - Cultivo primário de células testiculares HIV-1/Bal, 4h após infecção

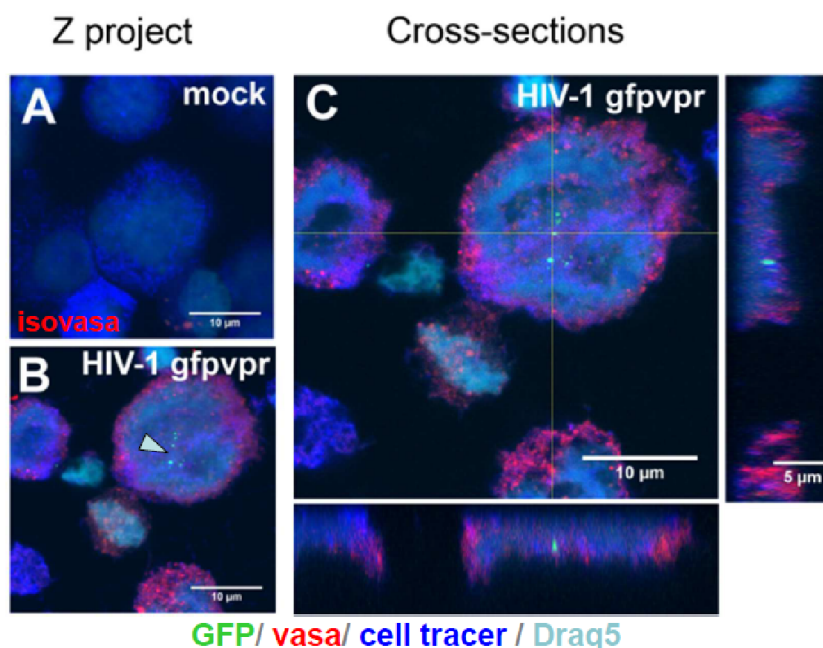


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: É possível observar células germinativas com dupla marcação p24 (pontos vermelhos, setas brancas) e

VASA (verde), em associação com DRAQ5, marcação nuclear, azul. No detalhe, células não infectadas (ni). Microscopia confocal, 600x. Barra: 5µm.

Figura 10 - Cultivo primário de células testiculares HIV-1/gfpvpr após infecção



Fonte: Elaborado pela autora.

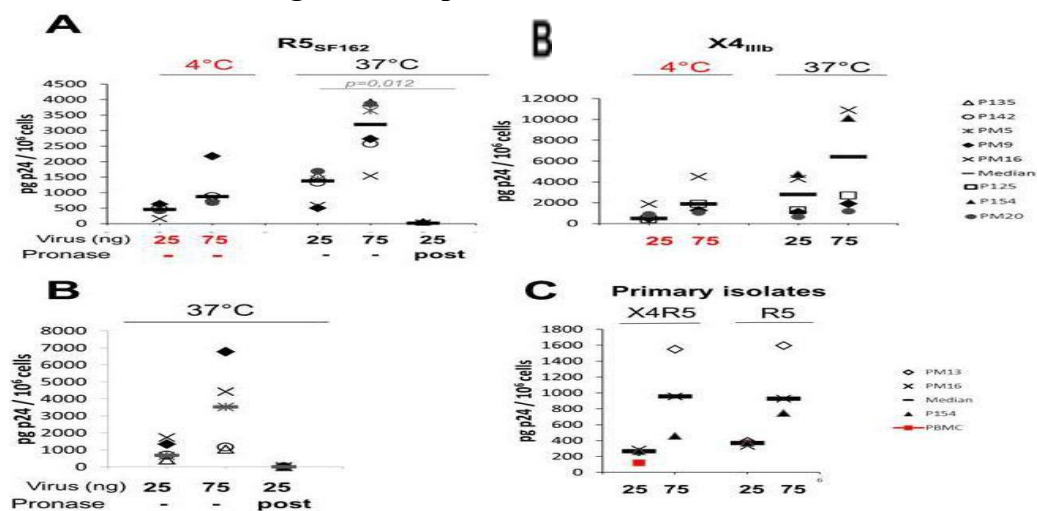
Legenda: Em A, células controle com isotipo VASA. Em B (projeção Z project-Image J) e C (secção transversal) é possível observar células germinativas VASA (vermelho) com marcação p24 (pontos verdes) e em associação com DRAQ5, marcação nuclear, azul-clara e *Cell tracer* em azul-escuro. Microscopia confocal, 600x. Barra : 10 µm. Secções transversais 5 µm.

5.2.1 ELISA binding Assay

A análise dos resultados obtidos através do ELISA *binding Assay* mostrou que o HIV-1 (cepas R5 or X4) pode se ligar às células germinativas em cultivo primário (Fig. 11 A e B). Esta ligação envolve receptores de natureza proteica, como demonstrado pela diminuição das partículas ligadas na presença da pronase (Fig. 11A e 12 A). Um maior número de partículas ligadas foi observado na concentração de 75 ng e à temperatura de 37°C (Fig.11 A e B). Esta ligação é dependente da proteína do envelope viral gp120, como pode ser visto na Fig. 12 B. Os receptores heparan sulfato e de manose estão envolvidos nesta interação, como demonstrado pelo efeito de diminuição das partículas ligadas na presença dos competidores heparina, manose + BSA e manam (Fig 12 C, D).

Figura 11 - Resultados do ELISA *binding Assay* para células testiculares isoladas

infectadas (n=8) com HIV-1 cepas R5 SF162 (A) e X4 IIIb (B), nas concentrações de 25 e 75 ng e nas temperaturas 4°C e 37°C

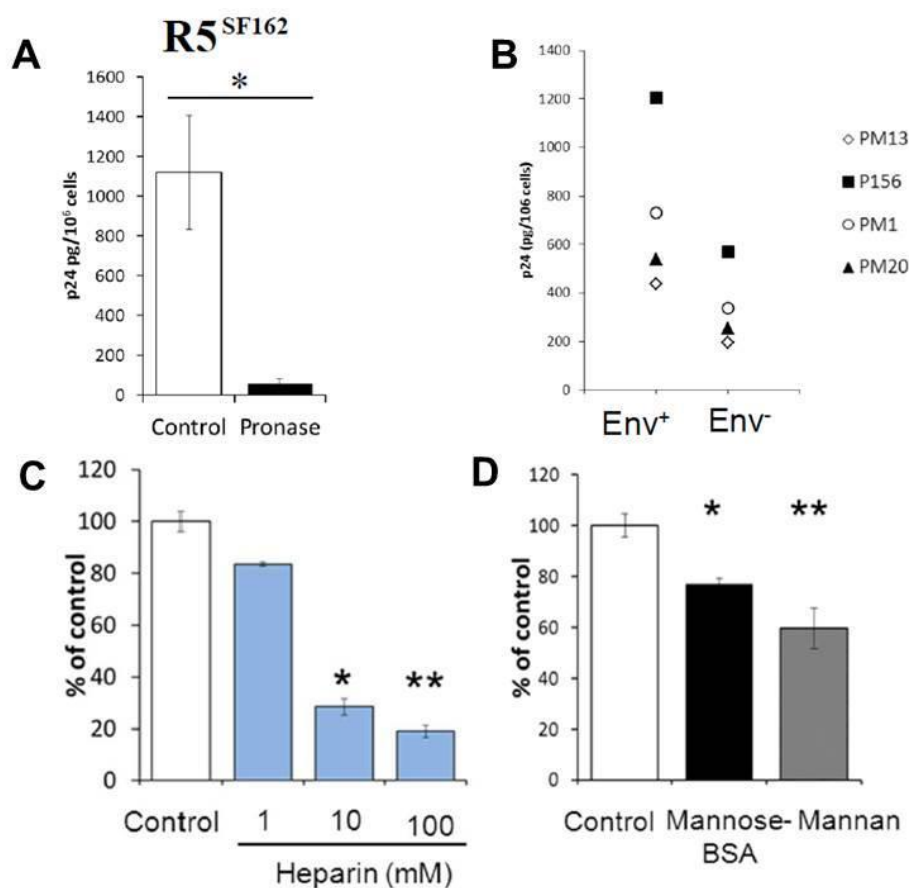


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda:

- Em A, observa-se o efeito da pronase.
- P, paciente submetido à orquiectomia terapêutica;
- PM, pós-morte.

Figura 12 - Resultados do ELISA *binding Assay* para células testiculares isoladas infectadas com HIV-1 cepa R5 SF162



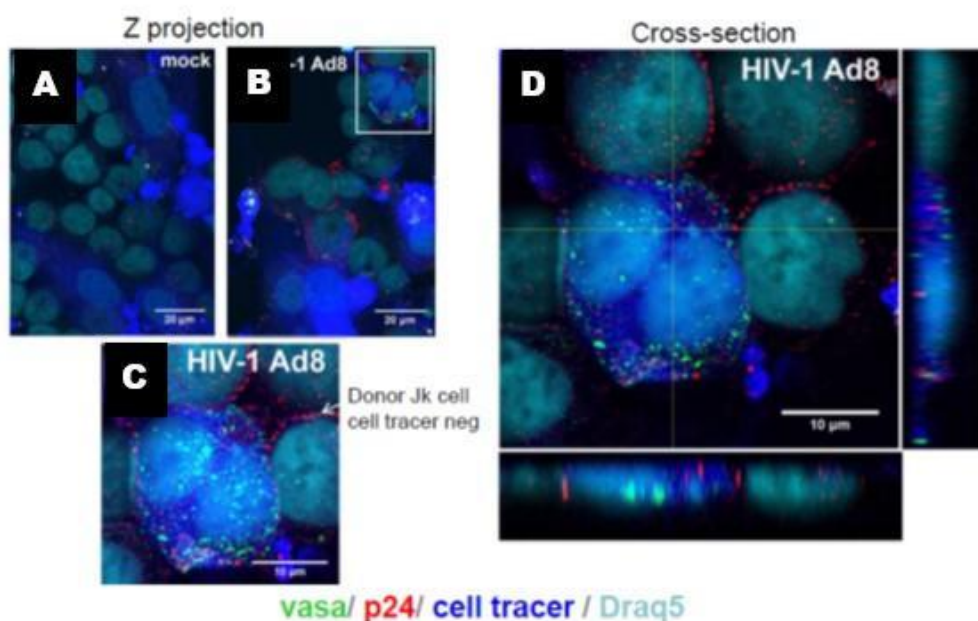
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Em A, observa-se o efeito da pronase. Em B, demonstra-se ligação dependente de Env gp120. C, efeitos competidores da heparina nas concentrações 1, 10, 100 mM. D, efeito dos competidores manose-BSA e manam.

5.2.2 Infecção célula-célula

Foi possível observar a transmissão de partículas p24 entre células Jurkat infectadas (vírus HIV-1 Ad8) e PBMC (HIV-1 ARP1114) em co-cultura com células germinativas (Fig. 13 A - D e 14 A, B). As partículas foram observadas na superfície e no interior das células VASA+, como observado em secções transversais e projeções das imagens obtidas com microscopia confocal.

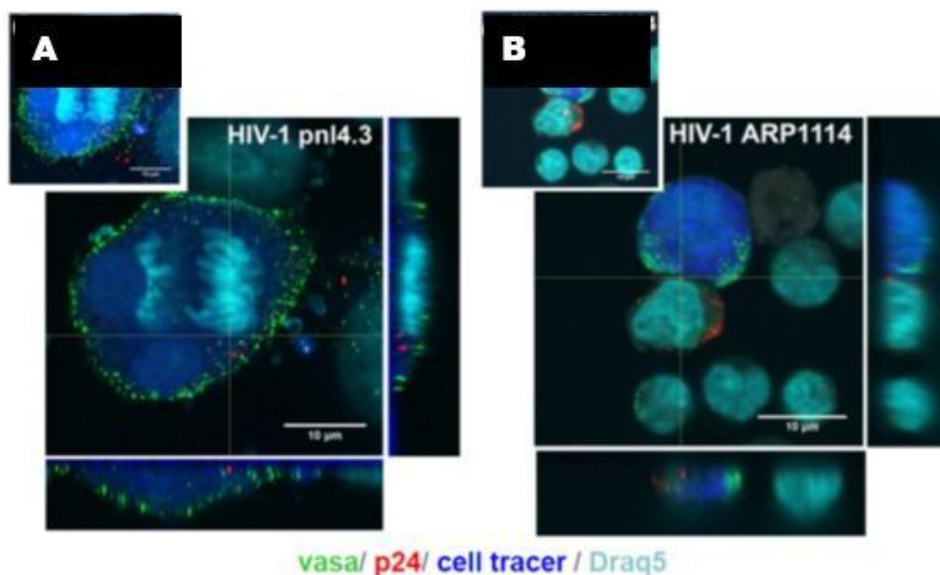
Figura 13 - Células testiculares de co-cultivo primário em contato com células Jurkat infectadas com HIV-1/Ad8



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Em A, B, C (projecção Z project - Image J) é possível observar células germinativas VASA+ (verde) em divisão com dupla marcação para p24 (pontos vermelhos) e, em associação com DRAQ5, marcação nuclear, azul-clara e traçador celular em azul-escuro nas células germinativas. Nas secções transversais (D), observa-se a marcação p24 em contato com a célula VASA. Microscopia confocal, 600x. Barra: 10 μ m.

Figura 14 - Co-cultura de células testiculares e células Jurkat infectadas com HIV-1/pn13



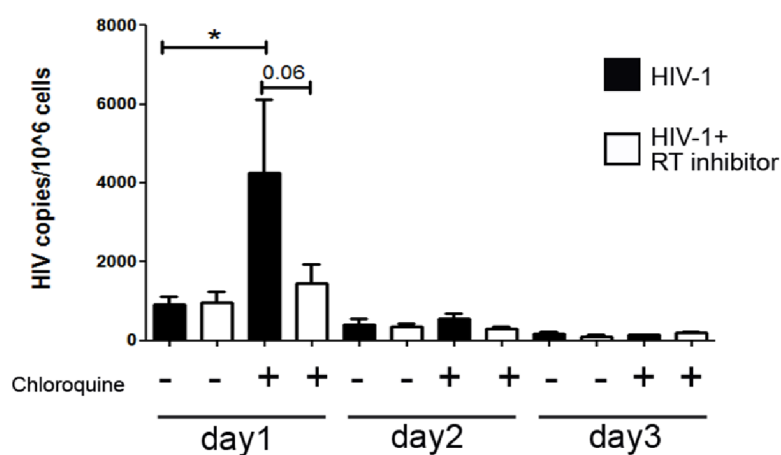
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Em A, B, C (projecção Z project - Image J) é possível observar células germinativas VASA+ (verde) em divisão com dupla marcação para p24 (pontos vermelhos) e, em associação com DRAQ5, marcação nuclear, azul-clara e traçador celular em azul-escuro nas células germinativas. Nas secções transversais (D), observa-se a marcação p24 em contato com a célula VASA. Microscopia confocal, 600x. Barra: 10 μ m.

5.2.3 Transcrição reversa do HIV-1 nas células germinativas

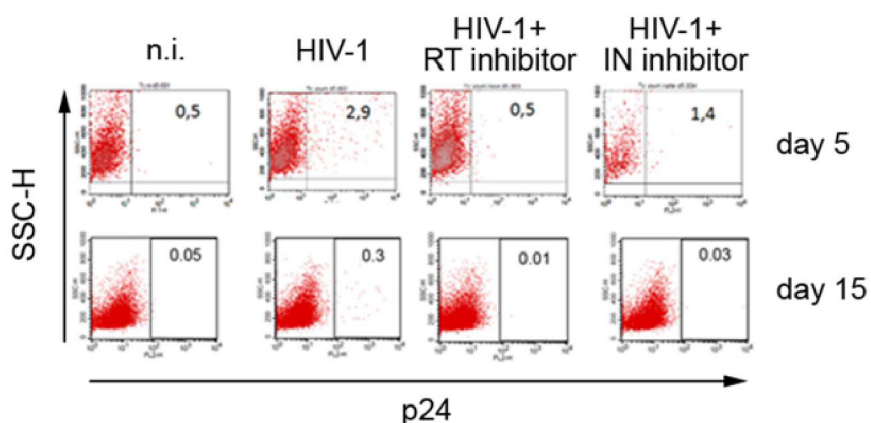
A análise através de PCR quantitativo mostrou que a transcrição reversa acontece nas células germinativas totais na cultura inicial (dia 1) e foi inibida pela nevirapina. O efeito somente pode ser detectado após exposição à cloroquina (Fig. 15). Resultados das análises de citometria de fluxo das células germinativas após infecção com o HIV-1, no 5º e 15º dias após a infecção mostraram que o percentual de células infectadas foi reduzido na presença de nevirapina, bem como na presença do raltegravir (Fig. 16).

Figura 15: PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células germinativas totais, na presença e ausência da nevirapina e cloroquina, nos dias 1, 2 e 3 após infecção (HIV-1)



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16 - Resultados das análises de citometria de fluxo das células germinativas após infecção com o HIV-1, dias 5 e 15 dias após a infecção



Fonte: Elaborado pela autora.

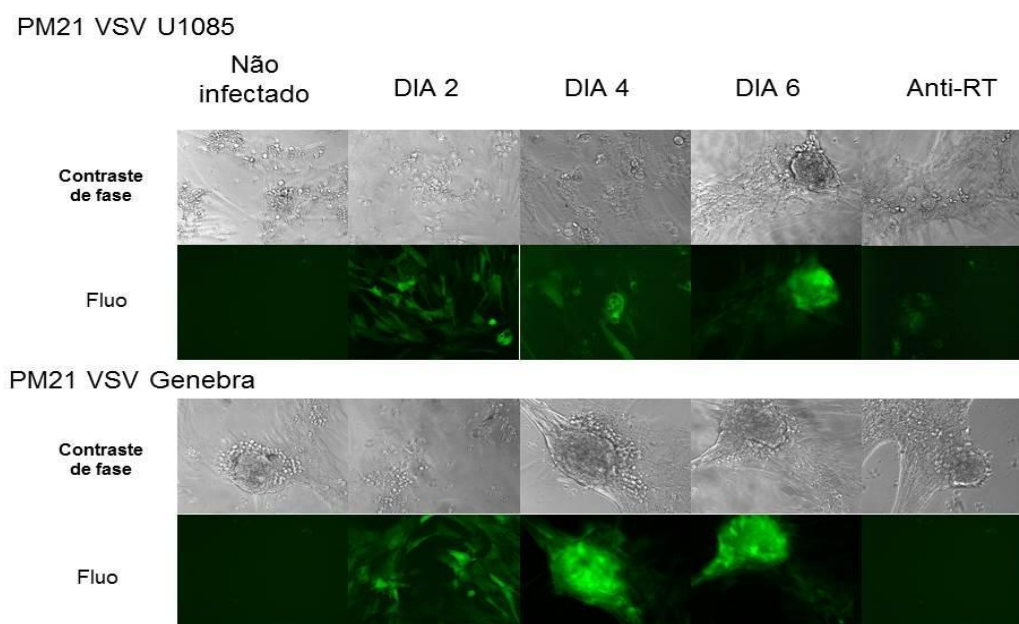
Legenda: O percentual de células infectadas foi reduzido na presença de nevirapina, bem como na presença do raltegravir.

5.3. Infecção de células germinativas em cultivo primário pelos pseudovírus VSV

5.3.1. Culturas a fresco

Em nossos estudos observamos que o pseudo-VSV pode infectar células testiculares *in vitro*. Esta infecção foi comprovada pelo aumento crescente da intensidade da fluorescência ao longo do período da cultura. O pico máximo de fluorescência foi observado entre os dias 4 e 6 pós-infecção. Apesar de terem sido testadas 2 cepas diferentes (VSV U1085 e VSV Genebra), nenhuma diferença evidente quanto a intensidade de fluorescência foi observada (Fig. 17).

Figura 17 - Células de cultivo primário infectadas com o lentivírus pseudo VSV em culturas a fresco

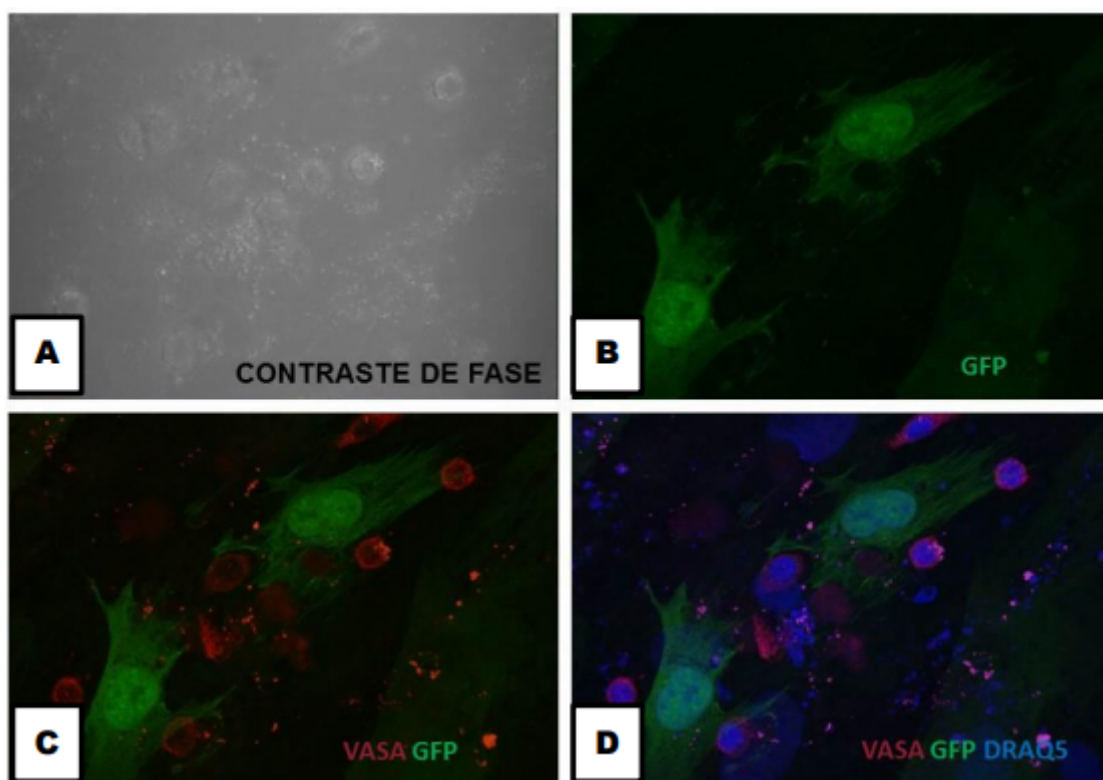


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Aumento da expressão da GFP é observado a partir do dia 2 pós-infecção, atingindo-se o máximo no dia 6. A presença da nevirapina (anti-RT) inibiu a expressão da GFP.

A semelhança do observado para as células em cultivo primário não infectadas, não foi evidenciada a expressão GFP em células VASA+ após infecção com pseudo VSV (Fig. 18 B-D).

Figura 18 - Culturas primárias de células testiculares infectadas *in vitro* com pseudovírus VSV



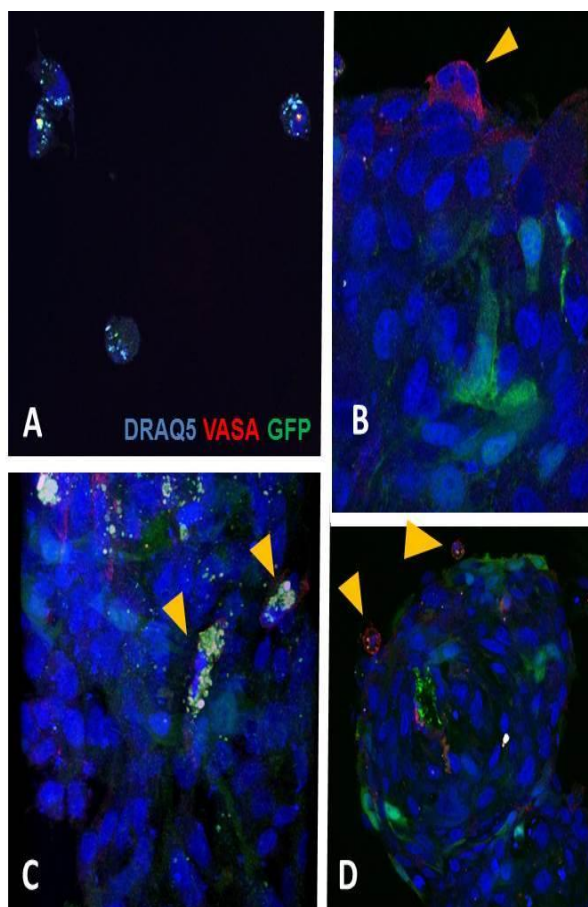
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Em A, evidencia-se o aspecto da cultura em contraste de fase na qual se observa os contornos arredondados das células germinativas, localizadas sobre a camada de células aderidas. Em B, nota-se células da camada somática expressando GFP. Em C e D são observadas as células VASA+ (vermelhas, Alexa 594) negativas para GFP. Não foi evidenciada co-localização das marcações. Microscopia Confocal, 600x.

5.3.2. Culturas após descongelamento de fragmentos de testículo

Nesta etapa de nossos estudos, culturas obtidas de amostras testiculares descongeladas foram submetidas à infecção pelo pseudovírus VSV, seguindo-se os mesmos protocolos utilizados nas culturas obtidas a partir de tecido fresco. Assim, o mesmo padrão de expressão de GFP foi observado, com o pico ocorrendo entre os dias 4 e 6 pós-infecção. Células somáticas infectadas foram observadas em todos os experimentos (Fig. 19 A-D) e células VASA+ com morfologia normal (Fig. 19 B) não infectadas estavam associadas a estas células somáticas, formando colônias (Fig. 19 B-D). Entretanto, células germinativas isoladas expressando GFP foram raramente observadas (Fig. 19 A). Contudo, estas células não apresentavam morfologia típica das células VASA+ (Fig. 19 B) presentes nas demais culturas realizadas.

Figura 19 - Culturas primárias de células testiculares infectadas *in vitro* com pseudovírus VSV (amostra após descongelamento) onde são observadas células VASA/Alexa 594, VSV/GFP, e núcleos corados com Draq5



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Em A, observa-se células germinativas isoladas com marcação co-localizada VASA/GFP (pontos claros). Já em B, são observadas células VASA+ com aspecto normal na superfície da colônia contendo células somáticas GFP. Por outro lado, em C, observam-se células germinativas no interior de uma colônia (projeção tridimensional), com marcação co-localizada VASA/GFP (cabeça de seta). Em D, células VASA+ com aspecto atípico na superfície de uma colônia e marcação GFP co-localizada (cabeça de seta). Microscopia confocal: A e D (600x); B (1500x); C (1200x).

5.4. Infecção nas células da linhagem TCam-2

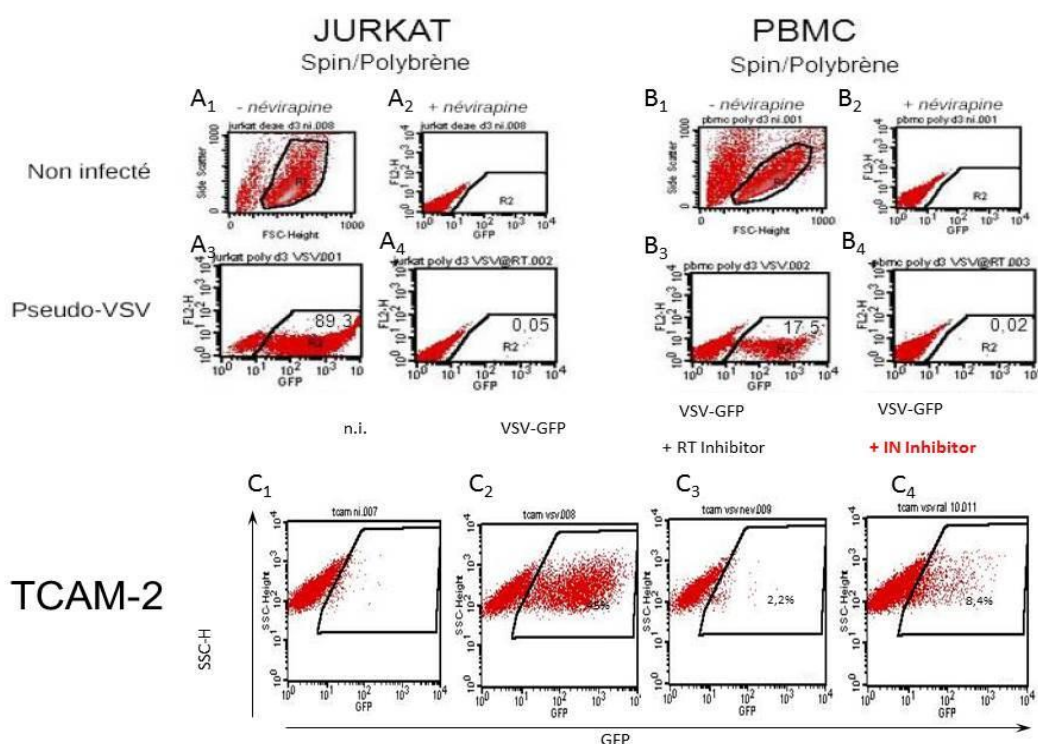
5.4.1. Citometria de Fluxo

A infecção das células TCam-2 (e dos controles positivos Jurkat e PBMC) pelo pseudovírus VSV foi analisada por citometria de fluxo para detecção da expressão de GFP. Assim, 3 dias após a infecção o percentual de células positivas foi de 89% para as células Jurkat (Fig. 20 A3), 18% e 45%, para as PBMC (Fig. 20 B3) e TCam-2 (Fig. 20 C2), respectivamente. Foi demonstrado também que a adição da nevirapina, um inibidor na

transcriptase reversa, reduziu o percentual de células positivas em todos os grupos (Fig. 20 A3, A4, B3, B4 e C2, C3).

Neste contexto, a integração do genoma HIV foi avaliada pela infecção das células TCam-2 com um VSV não replicativo na presença e ausência de inibidor de integração viral, o raltegravir. Foi ainda observada redução do sinal GFP (de 45% para 8%) quando o raltegravir foi adicionado (Fig. 20 C2 e C4).

Figura 20 - Resultados das análises de citometria de fluxo das células Jurkat, PBMC e TCam-2 após infecção com o pseudovírus VSV, 3 dias após a infecção



Fonte: Elaborado pela autora.

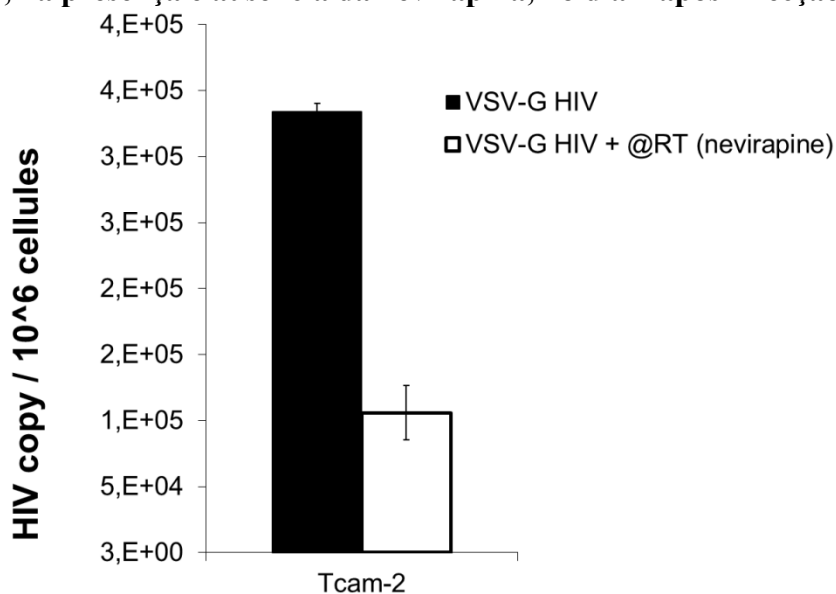
Legenda: O percentual de células GFP+ foi reduzido na presença de nevirapina (Jurkat, A3, A4; PBMC, B3, B4 e TCam-2, C2, C3), bem como na presença ou ausência do raltegravir (TCam-2, C2, C4).

5.4.2 Transcrição reversa do HIV-1 em células TCam-2

A avaliação quantitativa de DNA viral pelo PCR mostrou que o pseudovírus com envelope VSV propiciou resultados positivos de infecção nas células Jurkat e PBMC, bem como nas células TCam-2, e a diminuição de pelo menos um Log foi observado nas células tratadas com a nevirapina (Fig. 21). Observou-se ainda que a quantidade de DNA viral detectado nas diferentes linhagens celulares estava correlacionada com o percentual de células

GFP+.

Figura 21 - PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células da linhagem Tcam-2, na presença e ausência da nevirapina, no dia 1 após infecção (VSV-G)

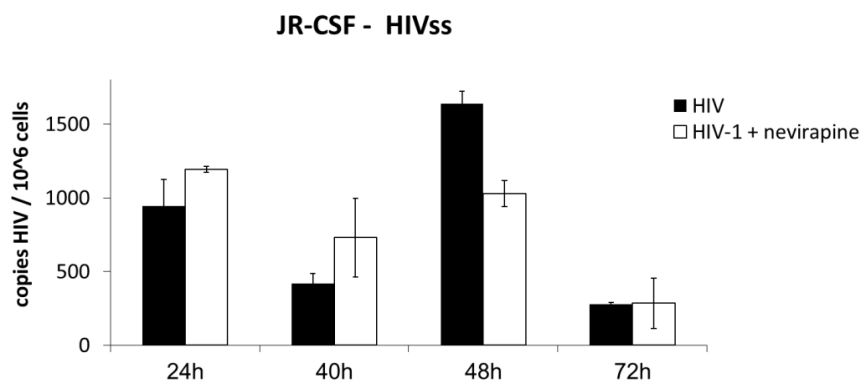


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A transcrição reversa foi inibida na presença da nevirapina.

Comparando-se as infecções das células permissivas (Jurkat e PBMC) com as cepas virais de HIV foram observados resultados positivos para todas as cepas utilizadas, quais sejam SF162, IIIb, JR-CSF e Bal no PCR quantitativo. De maneira semelhante, o uso da nevirapina diminuiu a quantidade de DNA viral na ordem de uma unidade logarítmica. A infecção das células Tcam-2 não mostrou resultados positivos (nenhuma diferença com ou sem nevirapina) para as cepas SF162, IIIb e Bal. Utilizando-se a cepa JR-CSF, foi notada diminuição da quantidade de DNA viral após 2 dias de infecção com o uso da nevirapina, o que sugere que a cepa JR-CSF poderia infectar as células Tcam-2 (Fig. 22).

Figura 22 - PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células da linhagem TCam-2, na presença e ausência da nevirapina, nos períodos 24-72 horas após infecção (HIV-JR-CSF)



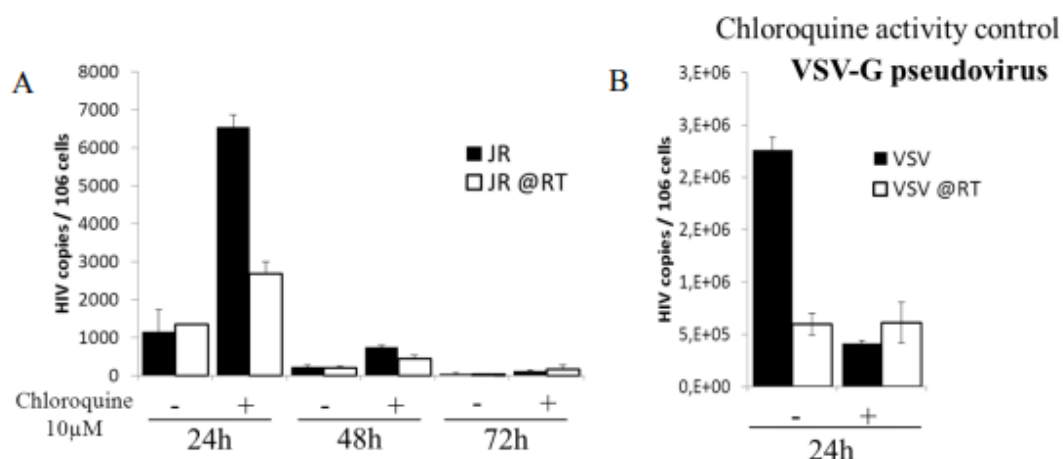
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A transcrição reversa foi inibida na presença da nevirapina.

5.5. Efeitos da Cloroquina em células Tcam-2 infectadas com HIV (JR-CSF) e VSV-G

Após exposição à cloroquina por 4 horas, nos períodos 24-72h após infecção com HIV-JR-CSF (A) e 24h após infecção horas com VSV-G (B), foi possível detectar, através de PCR quantitativo, DNA viral em células da linhagem TCam-2, na presença e ausência da nevirapina. A transcrição reversa foi inibida na presença da nevirapina (Fig. 23).

Figura 23 - PCR quantitativo para detecção de DNA viral em células da linhagem TCam-2, na presença e ausência da nevirapina, após exposição à cloroquina (4h), nos períodos 24-72 horas após infecção (HIV-JR-CSF, A) e 24 após infecção horas (VSV-G, B)



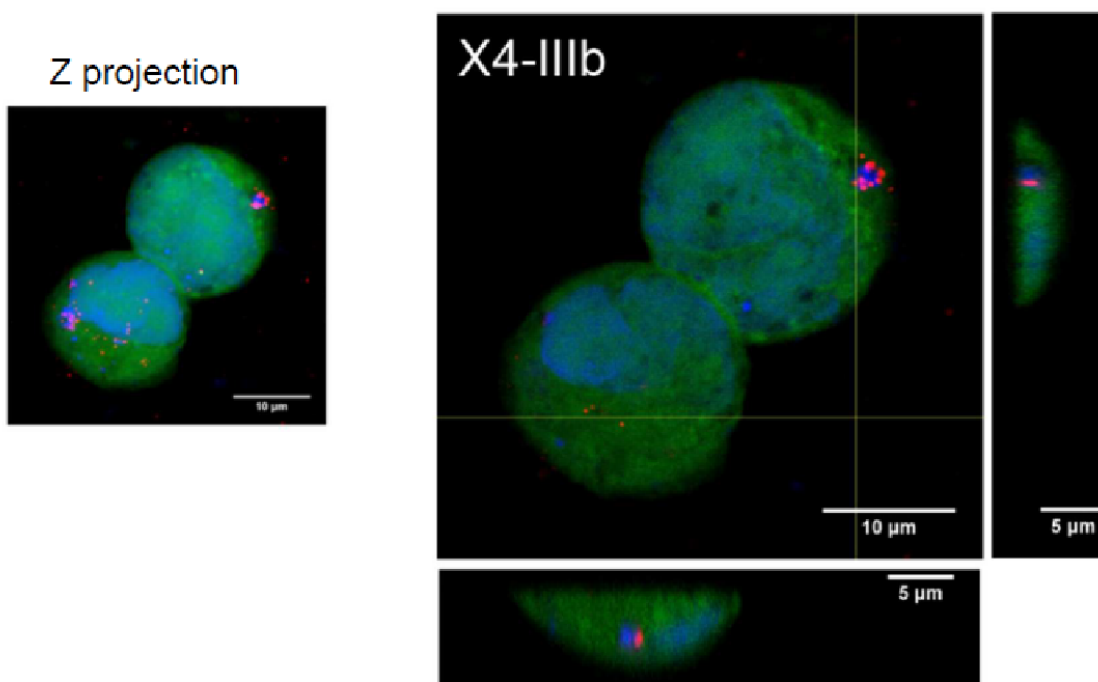
Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Detecção da p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1

Através da imunocitoquímica e análise das imagens obtidas no microscópio confocal, foi possível confirmar a internalização das partículas virais pelas células TCam-2. Esta internalização foi confirmada para as cepas HIV-1 Bal, IIIb (Fig. 24), JR-CSF (Fig. 25) e SF162, ARP1114 (Fig. 26).

Figura 24 - Detecção do p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1 (IIIb), tripsina 4h pós-infecção, em lamínulas cobertas com poli-L-lisina, onde evidenciou-se CFSE/FITC, p24/Alexa 594, e núcleo Draq5 corado em azul

HIV-1 IIIb

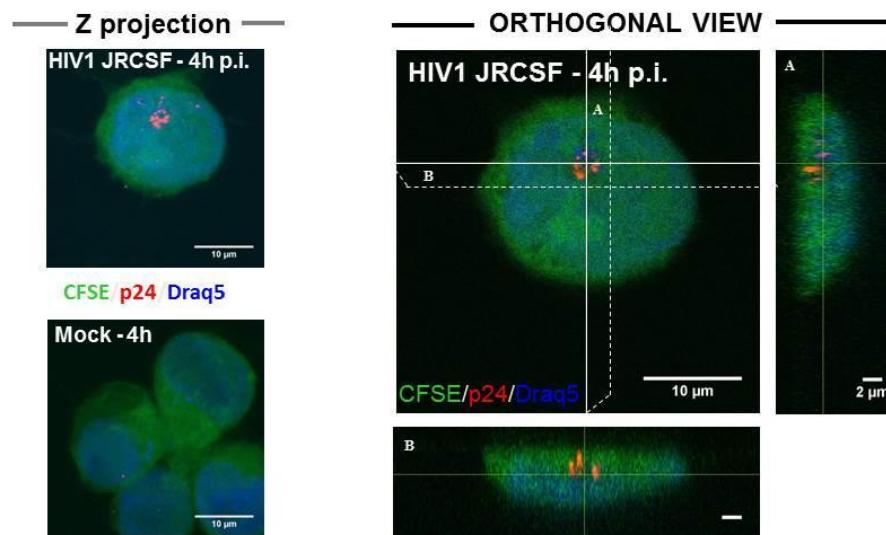


CFSE/p24/Draq5

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A utilização do escaneamento total seriado, em vista ortogonal tridimensional, permite detectar a presença do sinal p24 no interior destas células. Microscopia Confocal, 600x.

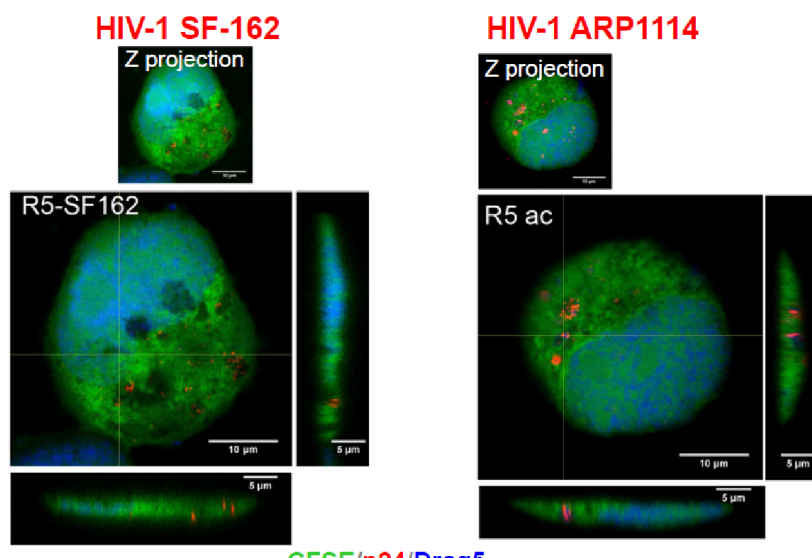
Figura 25 - Detecção do p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1 JR-CSF, tripsina 4h pós-infecção, em lamínulas cobertas com poli-L-lisina, onde evidenciou-se CFSE/FITC, p24/Alexa 594, e núcleo Draq5 corado em azul



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A utilização do escaneamento total seriado, em vista ortogonal tridimensional, permite detectar a presença do sinal p24 no interior destas células. Microscopia Confocal, 600x.

Figura 26 - Detecção do p24 em células TCam-2 infectadas com o vírus HIV-1 (SF-162 e ARP-1114), tripsina 4h pós-infecção, em lamínulas cobertas com poli-L-lisina, onde evidenciou-se CFSE/FITC, p24/Alexa 594, e núcleo Draq5 corado em azul



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A utilização do escaneamento total seriado, em vista ortogonal tridimensional, permite detectar a presença do sinal p24 no interior destas células. Microscopia Confocal, 600x.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo investigar a infecção *in vitro* das células germinativas testiculares pelo HIV. Assim, estabelecemos culturas de células germinativas humanas de curto (1 a 3 dias), médio (3 a 12 dias) e longo prazo (13 a 23 dias). Para este fim, foi seguido o protocolo de cultivo de células de camundongo (Van Pelt *et al*, 1996 ; Shinohara *et al*, 2003) adaptado para células testiculares humanas (Sadri-Ardekani *et al*, 2011). Entretanto, as condições ideais para os experimentos de infecção foram por nós desenvolvidos, uma vez que não há trabalhos anteriores descrevendo estes procedimentos.

Neste contexto, demonstramos que células testiculares humanas dissociadas podem reconstruir sua arquitetura original sob condições de cultivo usando-se um meio de cultura altamente enriquecido para células-tronco (StemPro-Invitrogen). O processo de reconstrução aconteceu de forma espontânea. Após 3 a 4 semanas em cultivo (25 dias pós-orquiectomia) estas células testiculares formaram agregados alongados. Estas estruturas eram tubulares e apresentavam lume.

Relatos anteriores (Hadley *et al.*, 1985; Tung and Fritz, 1980, 1987; Tung *et al.*, 1984) mostraram que células germinativas são capazes de se organizar *in vitro* em cordões celulares semelhantes a túbulos seminíferos movidos por propriedades celulares intrínsecas. Recentemente, processo similar foi descrito para camundongos (Yokonishi, 2013; Makela, 2014) e ratos (Reda *et al*, 2014) após cultura de células testiculares dissociadas.

Até o presente momento, este é o primeiro relato descrevendo a formação de estruturas cordonais semelhantes a túbulos seminíferos *in vitro* após cultura de células testiculares humanas dissociadas.

Como relatado em camundongos (Makela *et al*, 2014), a formação de estruturas cordonais resultou de uma compactação da rede celular sugerindo um papel ativo de células peritubulares mioides (PMC) no processo, ao mesmo tempo que colônias contendo células

germinativas pareciam coordenar o processo. Hadley e colaboradores (1985) mostraram que o cultivo de células de Sertoli de rato em gel formando uma membrana basal induzia a morfogênese das células em cordões, os quais se pareciam com o órgão de origem destas células e formavam um ambiente propício à diferenciação das células germinativas. O mesmo experimento sugeriu que a capacidade de formar cordões seria intrínseca às células de Sertoli. Sofitakis (2005) propôs que células de Sertoli seriam indispensáveis para a espermatogênese *in vitro*. Estudos subsequentes revelaram que pelo menos um outro tipo celular (a célula peritubular mioide) seria também imprescindível para a formação de cordões testiculares funcionais (Ungewitte and Yao, 2013). No presente estudo, foi possível demonstrar, através de imunomarcção dos agregados celulares cordonais formados *in vitro*, células Sox9-positivas localizadas no epitélio. Células positivas para o Sox9 foram também observadas em túbulos de camundongo reconstruídos *in vitro* e em colônias formadas *in vitro* (Yokonishi, 2013). Células de Sertoli são essenciais para a formação dos cordões seminíferos do feto e suporte à espermatogênese no início da puberdade. A expressão do SRY no feto masculino induz a expressão da *SRY related homeobox protein 9* (Sox9) e estimula genes essenciais para o funcionamento das células de Sertoli. A proliferação e diferenciação das células de Sertoli resultam na formação de cordões que envolvem células germinativas. Os cordões seminíferos, a versão fetal dos túbulos seminíferos, são formados por células germinativas cercadas por camadas concêntricas de células de Sertoli, membrana basal, e células peritubulares mióides (Ungewitte & Yao, 2013). Esta mesma constituição foi observada no presente trabalho, nos agregados formados *in vitro* a partir das células testiculares dissociadas.

Segundo o modelo proposto por Ungewitte & Yao (2013) para a formação dos cordões celulares, as células peritubulares mióides se organizam em torno das bordas dos cordões e interagem com as células de Sertoli para produzir as proteínas da matriz extracelular (ECM), como a laminina, fibronectina e colágeno (Hadley *et al.*, 1985; Skinner *et al.*, 1985). Estas proteínas da ECM formam uma membrana basal que envolve os cordões, resultando na formação de um ambiente propício para que ocorra a espermatogênese. Desenvolvimento semelhante foi verificado em nosso experimento, no qual agregados de camadas concêntricas de células positivas para Sox9 envolviam grupos de células germinativas (VASA+, MAGEA4+), os quais posteriormente formavam cordões alongados com um lume central.

Células peritubulares mióides contém filamentos de actina que contribuem para a estrutura e contratilidade celular. A α -SMA é somente expressa após diferenciação dependente de andrógeno durante a puberdade. As células peritubulares podem ser parte do

nicho espermatogonial, de modo que pode ser imputado a elas um papel no desenvolvimento testicular e também na espermatogênese (Reuter *et al*, 2012). No contexto do presente estudo, células α -SMA-positivas foram encontradas dispostas ao redor das estruturas tubulares formadas *in vitro* apresentando uma localização compatível com a das peritubulares mioides.

Não foram identificadas células de Leydig nas culturas realizadas neste trabalho. O processo de isolamento das células testiculares por nós utilizado eliminou a grande maioria destas células. Análise de citometria de fluxo (dados não apresentados) mostrou somente 1% destas células após a dissociação enzimática. Embora as células de Leydig sejam importantes para a manutenção da espermatogênese *in vivo* por meio da produção de andrógenos, *in vitro* sua função foi provavelmente substituída pela suplementação hormonal e de fatores de crescimento adicionados aos meios de cultura.

Até muito recentemente, não existiam marcadores bioquímicos que permitissem a identificação inequívoca de células-tronco espermatogoniais (SSCs), células estas que existem em proporção muito baixa nos testículos (De Rooij e Russell, 2000). O uso de marcadores específicos tornou sua identificação *in vitro* possível (Mahmoud, 2012). A população de células testiculares humanas que resultou na formação de cordões expressava genes específicos de espermatogônias pré-meióticas, incluindo SSEA-4, THY1 (CD90), MAGE-A4, Stra8, GRFA1 (Von Kopylow *et al*, 2010; Kossack *et al.*, 2013) e também o marcador de células germinativas DDX4 (VASA, Castrillon *et al*, 2000).

O SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigen-4*) foi recentemente validado como um marcador de superfície específico de células germinativas em culturas testiculares primárias (Zheng *et al*, 2014). No presente estudo foi possível demonstrar a presença de células positivas para SSEA4 na população inicial de células testiculares dissociadas e também após 3 semanas de cultivo. MAGE-A4 é um marcador de espermatogônias e de espermátocitos primários em pré-leptóteno. O início da segunda divisão meiótica provavelmente bloqueia a expressão do gene MAGE-A4 (Takahashi *et al*, 1995; Aubry *et al.*, 2001; Wyns *et al*, 2008). Em algumas regiões do tecido neoformado, a disposição das células mostrava uma polaridade nos cordões formados, com células MAGE-A4-positivas localizadas na região basal, isoladas ou formando grupos.

Células VASA-positivas foram observadas durante todo o período no qual as culturas foram mantidas. A marcação imunohistoquímica mostrou células testiculares isoladas formando colônias contendo células germinativas. As células VASA-positivas apresentavam uma tendência a se posicionar na camada mais superior da cultura, repousando em cima de uma camada de células somáticas. VASA é um marcador de células da linhagem germinativa

em ambos os sexos. Imunomarcação para VASA em testículo humano mostrou que as espermatogônias em contato com a membrana basal exibiam uma intensidade de sinal fraco e intermediário, enquanto espermatócitos e espermatídes exibiam uma forte marcação (Castrillon *et al*, 2000). Acredita-se que o gene VASA é um regulador de tradução na determinação e manutenção das células da linhagem germinativa (Yajima & Wessel, 2011). VASA em combinação com MAGE-A4 marcou, especificamente, espermatogônias de sagui (Eildermann *et al*, 2012).

As culturas foram iniciadas com uma população mista de células, contendo principalmente células germinativas (70% VASA-positivas, 15% SSEA-4-positivas) e uma pequena quantidade de células somáticas (4% HLAABC+; *class I major histocompatibility antigen*). As células germinativas mais avançadas e espermatozoides foram gradualmente removidos após tripsinização e trocas de meio. Consequentemente, a proporção de células germinativas versus células somáticas se inverteu para 96-98% de células somáticas HLAABC(+) e 4-2% células germinativas HLAABC(-). As mesmas observações foram citadas por Chikhovskaya e colaboradores (2014). O LIF (*Leukemia inhibitory factor*) interfere no crescimento celular inibindo a diferenciação, o que poderia, parcialmente, explicar a ausência de células mais diferenciadas no tecido formado, pela supressão da diferenciação das espermatogônias. O LIF é produzido na gônada masculina pelas células peritubulares e promove a sobrevivência e a proliferação de gonócitos de rato (Kanatsu-Shinohara *et al*, 2007).

Neste trabalho descrevemos células Stra8-positivas em tecido testicular humano em cultura pela primeira vez. O gene Stra8 codifica uma proteína citoplasmática expressada especificamente na gônada masculina em desenvolvimento durante a embriogênese do camundongo. Em animais adultos, sua expressão está restrita às células pré-meióticas (Oulad-Abdelghani *et al*, 1996). Já foi bem documentado que a meiose é iniciada por indução do Stra8 pelo ácido retinóico nas linhagens germinativas feminina e masculina de vertebrados superiores e é altamente expresso na fase pré-meiótica das células germinativas nos ovários e testículos (Dong *et al*, 2013). O gene STRA8 já foi detectado no testículo humano. Pelo seu padrão de expressão e homologia na sequência de aminoácidos entre camundongo e humano acredita-se que este gene também tenha papel na espermatogênese humana (Miyamoto *et al*, 2002). Guan e colaboradores (2009) descobriram que, depois de breve período de cultura, a população de células testiculares adultas Stra8-positivas era capazes de gerar células-tronco semelhantes às embrionárias. No presente estudo foram observadas células Stra8-positivas presentes nas colônias no 23º dia de cultura.

Tem sido sugerido por vários autores que o uso de Matrigel, ou meios de cultura contendo soro bovino, são fundamentais para induzir a formação de estruturas cordonais *in vitro* (Ungewitte and Yao, 2013). A laminina, um dos componentes da membrana basal, tem a capacidade de induzir a formação de estruturas em forma de cordão (Hadley *et al.*, 1990; Tung and Fritz, 1994, Zhang *et al.*, 2014). Em nosso experimento, utilizamos também soro bovino e placas de cultivo cobertas com laminina, detalhes que podem ter sido importantes na reorganização das células testiculares *in vitro*.

Através destas análises, demonstramos o rearranjo espontâneo de células somáticas e germinativas *in vitro* resultando na formação de estruturas alongadas organizadas, semelhantes a túbulos seminíferos. Mostramos que um sistema de cultura bidimensional de média complexidade foi adequado para células testiculares adultas isoladas se organizarem e formarem estruturas semelhantes a cordões testiculares. Embora ainda em seus primórdios, o potencial biotecnológico desta abordagem é enorme e poderá ser usada, por exemplo, em procedimentos para a preservação e tratamento da fertilidade, modificação genética das células germinativas, estudos da biologia do desenvolvimento gonadal, avaliação toxicológica, entre muitos outros. Acreditamos que melhores condições de cultivo, mas adequadas em respeito às condições físicas e fisiológicas (temperatura, ambiente endócrino e parácrino, arranjos 3D sustentando contato célula-célula) permitam que todo o processo meiótico ocorra *in vitro*.

Esta prévia caracterização do desenvolvimento de células testiculares *in vitro* foi imprescindível para a realização e entendimento dos resultados dos experimentos de infecção pelo vírus HIV-1 e pseudo-VSV.

Devido à complexidade do sistema de cultivo de células testiculares, foi utilizada também a linhagem de células germinativas derivadas de seminoma humano, as células Tcam-2. Para se estudar a natureza das interações entre as células germinativas testiculares e células Tcam-2 e o HIV, estas células foram analisadas para diferentes etapas da infecção: entrada viral (imunofluorescência para anticorpo viral p24), síntese e integração de DNA viral (Q-PCR/deteção de GFP por FACS), síntese de proteína viral (imunofluorescência para anticorpo viral p24/FACS), produção viral (ELISA). Neste sentido, os resultados obtidos mostraram que o HIV-1 pode entrar nas células Tcam-2. Esta internalização foi confirmada pela localização intracelular das partículas p24 após microscopia confocal de células Tcam-2 infectadas tratadas com pronase e foi mais intensa no tempo de 4h do que após 24 horas. O uso da cloroquina resultou em uma maior deteção do sinal p24, por maior retenção de partículas virais nas vesículas endossômicas. A cloroquina impede a acidificação de

endossomas e lissossomas, causando acúmulo de material endocitado. Este efeito foi observado após infecção com o pseudovírus VSV-G. O efeito observado na presença da cloroquina sugere uma entrada viral mediada por endocitose. Foi também observado aumento de transcrição reversa 24 horas após o tratamento com a cloroquina. Este efeito poderá ser confirmado em futuros experimentos através do uso de inibidores específicos. Contudo, a endocitose de vírus VSV é um processo rápido, como relatado por Johannsdottir *et al* (2009), com tempo médio de 2,5 a 3 minutos. Portanto, a detecção de produtos de retro-transcrição já seria possível antes de 4 horas de infecção.

A análise por qPCR com alvo em cDNA viral recém-sintetizado mostrou que o primeiro passo da transcrição reversa não ocorre espontaneamente após entrada do HIV. A transcrição reversa do HIV em células Tcam-2 ocorre quando a entrada é favorecida por um pseudovírus VSV-G de amplo tropismo (vírus replicativos e não replicativos) e após 24 horas de exposição à cloroquina.

A integração do vírus HIV em células Tcam-2 acontece também quando a entrada é favorecida por um pseudovírus VSV-G. Foi detectada a presença de p24 intracelular no dia 5 pós-infecção, através de FACS, e esta presença era diminuída na presença do Raltegravir, uma droga inibidora da integração viral. Eventos pós-integração foram também observados. Foi detectado *spliced* RNA viral usando-se qPCR. Através de ELISA, foi demonstrada a produção de partículas virais pelas células Tcam-2, assim como a presença de partículas virais no sobrenadante. Não foi possível confirmar a re-infecção com os vírus produzidos.

A infecção célula-célula de células Tcam-2 com o uso de doadores linfócitos Jurkat e PBMC infectados com o vírus VSV HIV-1 Ad8 resultou em pequeno número de células GFP de aspecto compatível com Tcam-2.

Estes resultados, em conjunto, mostram que as células Tcam-2 podem ser infectadas pelo HIV (cepas R5 e X4) e que esta entrada é mediada por endocitose. Esta infecção não seria produtiva. Resultados similares foram observados em células epiteliais renais, nas quais a infecção produtiva só ocorre após contato célula-célula (Blasi *et al*, 2014).

Foi também possível confirmar a ligação do vírus HIV-1 (cepas R5 e X4) às células germinativas testiculares. Esta ligação envolve receptores de natureza proteica, como demonstrado pela diminuição das partículas ligadas na presença da protease. Foi confirmado também o envolvimento dos receptores Heparan sulfato e receptor de manose nesta ligação. A ligação mediada por estes receptores foi descrita em espermatozoides (Ceballos, 2009; Cardona-Maya, 2011; Jadhav, 2011; Barbonetti, 2009; Dussaix, 1994).

Foi também observado o envolvimento da região *Env* do genoma do HIV, parte que é responsável pela síntese da proteína gp41 e gp120 do envoltório viral, na ligação. Usando-se pseudovírus HxB2 (*Env*⁺) e pseudovírus desprovidos de *Env* (*Env*⁻) foi possível a observar a participação de *Env*. O uso do anticorpo anti-gp120 diminui o percentual de células ligadas em relação ao controle.

A pesquisa pela entrada viral em células germinativas testiculares mostrou que este é um evento raro, (menos que 1% das células), observado apenas com o pseudovírus GFP-vpr. Não foi possível observar a partícula p24 internalizada em células VASA⁺, somente partículas ligadas à superfície destas células, após infecção com partículas virais livres. Após infecção célula-célula usando-se linfócitos Jurkat e PBMC infectados também foram observados somente eventos raros. Os eventos posteriores (transcrição reversa, integração) não foram observados em células germinativas testiculares.

Culturas de células germinativas congeladas ou células germinativas provenientes de fragmentos testiculares descongelados foram também utilizadas para experimentos de infecção pelo VSV-GFP. Células somáticas VASA⁻ mostraram crescente expressão GFP a partir do dia 2 até o dia 5, quando exibiram um máximo de fluorescência verde. Nas culturas foram observadas raras células isoladas VASA⁺ e também células VASA/GFP no centro de pequenas colônias. As células VASA⁺/GFP⁺ apresentavam morfologia atípica, com sinais de degeneração. Esta degeneração poderia ser causada pela infecção, pela proteína fluorescente verde, ou pelo processo do congelamento/descongelamento. Ainda, o processo de congelamento/descongelamento *per se* resultaria no aumento de susceptibilidade destas células à infecção pelo HIV. Portanto, esta hipótese poderá ser objeto de outros estudos no futuro.

Neste contexto, estes resultados em conjunto sugerem que o HIV-1 (cepas R5 e X4) pode ser internalizado por células germinativas em cultura, embora este evento seja raro. A cultura de células germinativas é um sistema complexo e dinâmico, e que apresenta um decréscimo de células germinativas em relação às células somáticas ao longo do tempo, o que dificulta a análise a médio e longo prazo. A necessidade desta co-cultura com células somáticas para a manutenção das células germinativas impede o uso de PCR ou ELISA para a detecção do vírus.

REFERÊNCIAS

- Anderson JA, Ping LH, Dibben O, Jabara CB, Arney L, Kincer L, Tang Y, Hobbs M, Hoffman I, Kazembe P, *et al*: **HIV-1 Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms.***PLoS Pathog* 2010, **6**.
- Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, van de Kant HJ, de Rooij DG. **Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro.** *Reproduction*. 2008; 136(5):543-557.
- Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, Xiao Z, Veenstra TD, Conrad TP, Lempicki RA, *et al*: **HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells.***Nat Immunol* 2008, **9**:301-309.
- Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL: **Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells.***Nat Med*, 1996, **6**:693-696.
- Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, Collodel G, Ceccarini EC, Crisa N, Di Caro A, Estenoz M, Garbuglia AR, Massacesi A, *et al*.: **HIV-particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte.***J-Cell-Biol* 1994, **127**:903-914.
- Baert Y, Van Saen D, Ning L, Haentjens P, Tournaye H, Goosens E. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum Reprod* 2013;**28**:1816 – 1826
- Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T, Oakes JW, Saah A, Pomerantz RJ: **Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1-infected men.***AIDS* 1994, **8**:1669-1674.
- Bagasra O, Freund M, Weidmann J, Harley G: **Interaction of human immunodeficiency virus with human sperm in vitro.***J Acquir Immune Defic Syndr* 1988, **1**:431-435.
- Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W, van der Graaf WT: **The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours.***Eur J Cancer* 2004, **40**:2064-2070.
- Beausejour Y, Tremblay MJ: **Envelope glycoproteins are not required for insertion of host ICAM-1 into human immunodeficiency virus type 1 and ICAM-1-bearing viruses are still infectious despite a suboptimal level of trimeric envelope proteins.***Virology* 2004, **324**:165-172.
- Bourry O, Mannioui A, Sellier P, Roucairol C, Durand-Gasselín L, Dereuddre-Bosquet N, Benech H, Roques P, Le Grand R: **Effect of a short-term HAART on SIV load in macaque tissues is dependent on time of initiation and antiviral diffusion.***Retrovirology* 2010, **7**:78.
- Brinster RL, Zimmermann JW: **Spermatogenesis following male germ-cell transplantation.** *Proc Nat Acad Scien USA*, 1994, **91**:11298–11302.

Camus C, Matusali G, Bourrya O: **Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4R T-cell infection.** *AIDS* 2016, **30**:1197–1208.

Cardona-Maya W, Velilla P, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT: **Presence of HIV-1 DNA in spermatozoa from HIV-positive patients: changes in the semen parameters.***Curr HIV Res* 2009, **7**:418-424.

Cardona-Maya W, Velilla PA, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT: **In vitro human immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor.***J Reprod Immunol* 2011, **92**:1-7.

Ceballos A, Remes Lenicov F, Sabatte J, Rodriguez Rodrigues C, Cabrini M, Jancic C, Raiden S, Donaldson M, Agustin Pasqualini R, Jr., Marin-Briggiler C, *et al*: **Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells.***J Exp Med* 2009, **206**:2717-2733.

Chalmel F, Rolland AD, Niederhauser-Wiederkehr C, Chung SS, Demougin P, Gattiker A, Moore J, Patard JJ, Wolgemuth DJ, Jegou B, Primig M: **The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis.***Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:8346-8351.

Chikhovskaya JV, van Daleen SKM, Korver CM, Repping S, Van Pelt AM: **Mesenchymal origin of multipotent human testis-derived stem cells in human testicular cell cultures.***Mol Hum Reprod* 2014, **20**: 155–167.

Choo EF, Leake B, Wandel C, Imamura H, Wood AJ, Wilkinson GR, Kim RB: **Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes.***Drug Metab Dispos* 2000, **28**:655-660.

Clapham PR, McKnight A, Talbot S, Wilkinson D: **HIV entry into cells by CD4-independent mechanisms.** In *HIV infection in CD4- cells. Volume 5*. Edited by Fantini J, Sabatier Jm: ESCOM Science Publishers B.V., Leiden, The Netherlands; 1996: 83-92

Clapham PR, McKnight A: **Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses.***J Gen Virol* 2002, **83**:1809-1829.

Cohen J: **HIV/AIDS research. Tissue says blood is misleading, confusing HIV cure efforts.***Science* 2011, **334**:1614.

Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring H, Mattheus U, Mack A, Wagner H, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert K, Stenzl A, Skutella T: **Generation of pluripotent stem cells from adult human testis.***Nature*, 2008, **456**: 344–349.

Conrad S, Hossein A, Hatami M, Kubista M, Bonin M, Hennenlotter J, Renninger M, Skutella T: **Differential gene expression profiling of enriched human spermatogonia after short- and long-term culture.***BioMed research international*, 2014, **2014**: 1-16.

Creemers LB, Meng X, den Ouden K, *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.** *Biol Reprod.* 2002;66(6):1579-1584.

Curaba M, Poels J, Van Langendonck A, Donnez J, Wyns C. **Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification?** *Fertil Steril* 2011; 95:2123.e9 – 2123.e12

De Jong J, Stoop H, Gillis AJ, Hersmus R, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, van Drunen E, Beverloo HB, Schneider DT, Sherlock JK, Baeten J, Kitazawa S, van Zoelen EJ, van Roozendaal K, Oosterhuis JW, Looijenga LH. **Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2.** *Gen Chromos Canc* 2008, 47:185-96.

Deleage C, Moreau M, Rioux-Leclercq N, Ruffault A, Jegou B, Dejuq-Rainsford N: **Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo.** *Am J Pathol* 2011, **179**:2397-2408.

de Rooij DG, Russell LD. **All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask.** *J Androl.* 2000;21(6):776-98.

Dinh MH, Okocha EA, Koons A, Veazey RS, Hope TJ: **Expression of structural proteins in human female and male genital epithelia and implications for sexually transmitted infections.** *Biol Reprod* 2012, **86**:32.

Dussaix E, Guetard D, Dauguet C, D'Almeida M, Auer J, Ellrodt A, Montagnier L, Auroux M: **Spermatozoa as potential carriers of HIV.** *Res Virol* 1993, **144**:487-495.

Eildermann K, Gromoll J, Behr R: **Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture.** *Hum Reprod*, 2012, **27**: 1754–67.

Eron J, Vernazza, PL, Johnston, DM, Seillier-Moiseiwitsch, F, Alcorn, TM, Fiscus, SA, Cohen, MS: **Resistance of HIV-1 to antiretroviral agents in blood and seminal plasma: implications for transmission.** *AIDS* 1998, **12**:F181-189.

Eyre RC, Zheng G, Kiessling AA: **Multiple drug resistance mutations in human immunodeficiency virus in semen but not blood of a man on antiretroviral therapy.** *Urology* 2000, **55**:591.

Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M: **Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity.** *J Virol* 1997, **71**:3588-3596.

Fromentin R, Tardif MR, Tremblay MJ: **Human hepatoma cells transmit surface bound HIV-1 to CD4+ T cells through an ICAM-1/LFA-1-dependent mechanism.** *Virology* 2010, **398**:168-175.

Gérard N, Syed V, Bardin CW, Genetet N, Jégou B: **Sertoli cells are the site of interleukin-1 alpha synthesis in rat testis.***Mol Cell Endocrinol* 1991, **82**:R13-R16.

Ghosn J, Viard JP, Katlama C, de Almeida M, Tubiana R, Letourneur F, Aaron L, Goujard C, Salmon D, Leruez-Ville M, *et al*: **Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men.***Aids* 2004, **18**:447-457.

Gifford RJ, Katzourakis A, Tristem M, Pybus OG, Winters M, Shafer RW: **A transitional endogenous lentivirus from the genome of a basal primate and implications for lentivirus evolution.***Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:20362-20367.

Gilbert C, Maxfield DG, Goodman SM, Feschotte C: **Parallel germline infiltration of a lentivirus in two Malagasy lemurs.***PLoS Genet* 2009, **5**:e1000425.

Golestaneh N, Beauchamp E, Fallen S, Kokkinaki M, Uren A, Dym M: **Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells.***Reproduction* 2009, **138**:151-162.

Goharbakhsh L, Mohazzab A, Salehkhoush S, Heidari M, Zarnani AH, Parivar K, Akhondi MM: **Isolation and Culture of Human Spermatogonial Stem Cells Derived from Testis Biopsy.***Avicenna J Med Biotechnol.* 2013, **5**:54-61.

Goossens E, Van Saen D, Tournaye H: **Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: From research to clinic.***Hum Reprod*, 2013 **28**:897–907.

Goujon C, Malim MH: **Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells.***J Virol* 2010, **84**:9254-9266.

Halfon P, Giorgetti C, Khiri H, Penaranda G, Terriou P, Porcu-Buisson G, Chabert-Orsini V: **Semen may harbor HIV despite effective HAART: another piece in the puzzle.***PLoS One* 2010, **5**:e10569.

Hammache D, Pieroni G, Yahi N, Delezay O, Koch N, Lafont H, Tamalet C, Fantini J: **Specific interaction of HIV-1 and HIV-2 surface envelope glycoproteins with monolayers of galactosylceramide and ganglioside GM3.***J Biol Chem* 1998, **273**:7967-7971.

Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE, Garbers DL: **Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells.***Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:14931–14936.

Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL: **Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture.***Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; **102**(48):17430-17435.

Heim CN, Fanslow DA, Dann, CT: **Development of quantitative microscopy-based assays for evaluating dynamics of living cultures of mouse spermatogonial stem/progenitor cells.***Biol Reprod*, 2012, **87**:1-11.

Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE: **Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes.***Microsc Res Tech* 2010, **73**:241-278.

Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. **Germ cell transplantation in goats.** *Mol Reprod Dev.* 2003;64(4):422-428.

Houzet L, Matusali G, Dejucq-Rainsford N: **Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen.** *J Infect Dis.* 2014 Dec 15;210 Suppl 3:S622-30

Hwang K, Lamb DJ: **New advances on the expansion and storage of human spermatogonial stem cells.***Curr Opin Urol* 2010, **20**:510-514.

Izadyar F, Wong J, Maki C, Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, Yuen C, Greilach S, Zhao HH, Chow M, *et al*: **Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis.***Hum Reprod* 2011, **26**:1296-1306.

Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, *et al*. **Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells.** *Reproduction.* 2003;126

Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. **Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis.** *Reproduction.* 2002;124(1):85-94.

Jadhav SK, Velhal SM, Deshpande A, Maitra A, Chinnaraj S, Bandivdekar AH: **Characterization of human immunodeficiency virus (HIV1C) variants in peripheral blood mononuclear cells and spermatozoa.***J Med Virol* 2011, **83**:760-767.

Kakiuchi K, Tsuda A, Goto Y, Shimada T, Taniguchi K, Takagishi K, Kubota H: **Cell-surface DEAD-box polypeptide 4-immunoreactive cells and gonocytes are two distinct populations in postnatal porcine testes.** *Biol Reprod* 2014 **90**: 1-1.

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T: **Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells.** *Biol Reprod*, 2003, 69:612–616.

Kanatsu-Shinohara M, Muneto T, Lee J, *et al*. **Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes.** *Biol Reprod.* 2008;78(4):611-617.

Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T: **Spermatogonial stem cell self-renewal and development.** *Ann Review Cell Dev Biol*, 2013, 29:163–87.

Katzourakis A, Tristem M, Pybus OG, Gifford RJ: **Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus.***Proc Natl Acad Sci U S A*2007, **104**:6261-6265.

Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. **Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants.** *Hum Reprod* 2005;20:1676 – 1687.

Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O. **Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment.** *Hum Reprod* 2007;22:1384 – 1395.

Koruji M, Shahverdi A, Janan A, Piryaei A, Lakpour MR, Gilani Sedighi MA: **Proliferation of small number of human spermatogonial stem cells obtained from azoospermic patients.** *Journ Assist Reprod Gen* 2012, 29, 9:957–967.

Kossack N, Terwort N, Wistuba J, Ehmcke J, Schlatt S, Schöler H, Kliesch S, Gromoll J. **A combined approach facilitates the reliable detection of human spermatogonia in vitro.** *Hum Reprod*, 2013, 28: 3012–25.

Kroodsma KL, Kozal MJ, Hamed KA, Winters MA, Merigan TC: **Detection of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pol gene: differences in semen and blood HIV-1 RNA and proviral DNA.** *J Infect Dis* 1994, 170:1292-1295

Kubota H, Avarbock MR, Brinster R.L: **Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:6487–6492.

Kvist K, Thorup J, Byslov AG, Hoyer PE, Mollgard K, Yding Andersen C. **Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism.** *Hum Reprod* 2006;21:484–491.

Lambert-Niclot S, Peytavin G, Duvivier C, Poirot C, Algarte-Genin M, Pakianather S, Meynard JL, Valantin MA, Molina JM, Flandre P, *et al*: **Low frequency of intermittent HIV-1 semen excretion in patients treated with darunavir-ritonavir at 600/100 milligrams twice a day plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors or monotherapy.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:4910-4913.

Lambert-Niclot S, Tubiana R, Beaudoux C, Lefebvre G, Caby F, Bonmarchand M, Naouri M, Schubert B, Dommergues M, Calvez V, *et al*: **Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey.** *AIDS* 2012.

Le Tortorec A, Dejuq-Rainsford N: **HIV infection of the male genital tract--consequences for sexual transmission and reproduction.** *Int J Androl* 2010a, 33:e98-108.

Le Tortorec A, Dejuq-Rainsford N: **Infection of semen-producing organs by HIV and role in virus dissemination.** *Med Sci* 2010b, 26:861-868.

Le Tortorec A, Le Grand R, Denis H, Satie AP, Mannioui K, Roques P, Maillard A, Daniels S, Jegou B, Dejuq-Rainsford N: **Infection of semen-producing organs by SIV during the acute and chronic stages of the disease.** *PLoS ONE* 2008a, 3:e1792.

Le Tortorec A, Satie AP, Denis H, Rioux-Leclercq N, Havard L, Ruffault A, Jegou B, Dejuq-Rainsford N: **Human prostate supports more efficient replication of HIV-1 R5 than X4 strains ex vivo.** *Retrovirology* 2008b, 5:119.

Lim JJ, Kim HJ, Kim K, Hong JY, Lee DR. **In vitro culture-induced pluripotency of human spermatogonial stem cells.** *BioMed Res Int*, 2013, 2013:1-9.

Lim JJ, Sung S-Y, Kim HJ, Song S-H, Hong JY, Yoon TK, Kim JK, Kim K-S, Lee DR: **Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions.** *Cell Prolif*, 2010, **43**:405–417.

Liao Z, Roos JW, Hildreth JE: **Increased infectivity of HIV type 1 particles bound to cell surface and solid-phase ICAM-1 and VCAM-1 through acquired adhesion molecules LFA-1 and VLA-4.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, **16**:355-366.

Liu Y, Liu H, Kim BO, Gattone VH, Li J, Nath A, Blum J, He JJ: **CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor.** *J Virol* 2004, **78**:4120-4133.

Livni E, Berker M, Hillier S, Waller SC, Ogan MD, Discordia RP, Rienhart JK, Rubin RH, Fischman AJ: **Preparation and pharmacokinetics of 11C labeled stavudine (d4T).** *Nucl Med Biol* 2004, **31**:613-621.

Matusali G, Dereuddre-Bosquet N, Le Tortorec A: **Detection of Simian Immunodeficiency Virus in Semen, Urethra, and Male Reproductive Organs during Efficient Highly Active Antiretroviral Therapy.** *J Virol* 2015 89:5772–5787. doi:10.1128/JVI.03628-14.

Mäkelä J-A, Toppari J, Rivero-Müller A, Ventelä S. **Reconstruction of Mouse Testicular Cellular Microenvironments in Long-Term Seminiferous Tubule Culture.** Schlatt S, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90088. doi:10.1371/journal.pone.0090088.

Maki CB, Pacchiarotti J, Ramos T, Pascual M, Pham J, Kinjo J, Anorve S, Izadyar F: **Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes.** *Hum Reprod* 2009, **24**:1480-1491.

Marcelin AG, Tubiana R, Lambert-Niclot S, Lefebvre G, Dominguez S, Bonmarchand M, Vauthier-Brouzes D, Marguet F, Mousset-Simeon N, Peytavin G, Poirot C: **Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma.** *Aids* 2008, **22**:1677-1679.

Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O: **Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis.** *J Virol* 2001, **75**:11166-11177.

Martin LA, Seandel, M **Propagation of adult SSCs: from mouse to human.** *BioMed Res Int*, 2013, 2013:1-9.

McInerney TL, McLain L, Armstrong SJ, Dimmock NJ: **A human IgG1 (b12) specific for the CD4 binding site of HIV-1 neutralizes by inhibiting the virus fusion entry process, but b12 Fab neutralizes by inhibiting a postfusion event.** *Virology* 1997, **233**:313-326.

Melaine N, Lienard MO, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H, Jegou B: **Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human.***Biol Reprod* 2002, **67**:1699-1707.

Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB: **HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes.***Cell* 2009, **137**:433-444.

Mizuno Y, Gotoh A, Kamidono S, Kitazawa S: **Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2).***Nihon Hinyōkika Gakkai zasshi. The Japanese journal of urology*, 1993, **84**: 1211–1218.

Moreau M, Le Tortorec A, Deleage C, Brown C, Denis H, Satie AP, Bourry O, Dereuddre-Bosquet N, Roques P, Le Grand R, Dejuq-Rainsford N: **Impact of short term HAART initiated during the chronic stage or shortly post-exposure on SIV infection of male genital organs.***PLoS One*, 2012;**7**:e37348.

Muciaccia B, Corallini S, Vicini E, Padula F, Gandini L, Liuzzi G, Lenzi A, Stefanini M: **HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects.***Hum Reprod* 2007, **22**:2868-2878.

Muciaccia B, Filippini A, Ziparo E, Colelli F, Baroni CD, Stefanini M: **Testicular germ cells of HIV-seropositive asymptomatic men are infected by the virus.***J Reprod Immunol* 1998, **41**:81-93.

Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. **Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes.***Biol Reprod.* 2001;**64**(5):1409-1416.

Nagano M, Patrizio P, Brinster RL. **Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes.***Fertil Steril.* 2002;**78**(6):1225-1233

Nickkholgh B, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Sadri-Ardekani H, Repping S, van Pelt AM: **Genetic and epigenetic stability of human spermatogonial stem cells during long-term culture.***Fertil Steril*, 2014a, **102**: 1700–1707.

Nickkholgh B, Mizrak SC, Korver CM, van Daalen SK, Meissner A, Repping S, van Pelt AM: **Enrichment of spermatogonial stem cells from long-term cultured human testicular cells.***Fertil Steril*, 2014b, **102**:558–565.

North TW, Higgins J, Deere JD, Hayes TL, Villalobos A, Adamson L, Shacklett BL, Schinazi RF, Luciw PA: **Viral sanctuaries during highly active antiretroviral therapy in a nonhuman primate model for AIDS.***J Virol* 2010, **84**:2913-2922.

O'Brien WA, Mao SH, Cao Y, Moore JP. **Macrophage-tropic and T-cell line-adapted chimeric strains of human immunodeficiency virus type 1 differ in their susceptibilities to neutralization by soluble CD4 at different temperatures.***J Virol* 1994, **68**:5264-5269.

Olinger GG, Saifuddin M, Spear GT: **CD4-Negative cells bind human immunodeficiency virus type 1 and efficiently transfer virus to T cells.***J Virol* 2000, **74**:8550-8557.

Orwig KE, Brinster CJ, Ryu B, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL: **Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation.** *Biol reprod*, 2003, **69**: 412–420.

Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, Greilach S, Zaragoza K, Olmstead M, Izadyar F. **Developing a clinical-grade cryopreservation protocol for human testicular tissue and cells.** *BioMed Res Int*, 2013, **2013**:1-10.

Pasquier C, Moinard N, Saune K, Daudin M, Trancart S, Massip P, Izopet J, Bujan L: **Antiviral effect of maraviroc in semen: a case report.** *Antivir Ther* 2012.

Pasquier CJ, Moinard N, Saune K, Souyris C, Lavit M, Daudin M, Izopet J, Bujan L: **Persistent differences in the antiviral effects of highly active antiretroviral therapy in the blood and male genital tract.** *Aids* 2008, **22**:1894-1896.

Picton HM, Wyns C, Anderson RA. **A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys** *Hum Reprod* 2015 30:11 2463–2475, doi:10.1093/humrep/dev190

Pillai SK, Good B, Pond SK, Wong JK, Strain MC, Richman DD, Smith DM: **Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env.** *J Virol* 2005, **79**:1734-1742.

Piravar Z, Jeddi-Tehrani M, Sadeghi MR, Mohazzab A, Eidi A, Akhondi MM: **In vitro Culture of Human Testicular Stem Cells on Feeder-Free Condition.** *J Reprod Infertil*, 2013, **14**:17–22.

Poels J, Van Langendonck A, Many MC, Wese FX, Wyns C. **Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia.** *Hum Reprod* 2013;28:578 – 589.

Poels J, Abou-Ghannam G, Herman S, Van Langendonck A, Wese F-X, Wyns C. **In search of better spermatogonial preservation by supplementation of cryopreserved human immature testicular tissue xenografts with N-acetylcysteine and testosterone.** *Front Surg* 2014;1:47

Pudney J, Nguyen H, Xu C, Anderson DJ: **Microscopic evidence against HIV-1 infection of germ cells or attachment to sperm.** *J Reprod Immunol* 1999, **44**:57-77.

Robillard KR, Hoque T, Bendayan R: **Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in rodent and human sertoli cells: relevance to the permeability of antiretroviral therapy at the blood-testis barrier.** *J Pharmacol Exp Ther* 2012, **340**:96-108.

Roulet V, Denis H, Staub C, Le Tortorec A, Delaleu B, Satie AP, Patard JJ, Jégou B Dejuq-Rainsford N: **Human testis in organotypic culture: application for basic or clinical research.** *Hum Reprod* 2006a, 21:1564–1575.

Roulet V, Satie AP, Ruffault A, Le Tortorec A, Denis H, Guist'hau O, Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Gicquel J, Jegou B, Dejuq-Rainsford N: **Susceptibility of human testis to human immunodeficiency virus-1 infection in situ and in vitro.** *Am J Pathol* 2006b, **169**:2094-2103

Ryu B-Y, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL: **Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats.** *Dev Biol*, 2004, **274**:158–170.

Ryu B-Y, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL: **Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005 **40**:14302–14307.

Ryu B-Y, Orwig KE, Oatley J M, Lin C-C, Chang L, Avarbock MR, Brinster RL: **Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells.** *J Androl*, 2007, **28**:353–360.

Ryu B, Kim B, Kim K, Kim Y, Lee Y, Kim B, Cho C, Kang H, Kim CG : **Efficient enhancement of lentiviral transduction efficiency in murine spermatogonial stem cells.** *Molecules and cells*, 2012, **33**:449–55.

Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, Hovingh S, de Reijke TM, de la Rosette JJ, van der Veen F, *et al*: **Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro.** *Jama* 2009, **302**:2127-2134.

Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AM: **Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro.** Research letter. *Jama* 2011, **305**: 2416–2418.

Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E. **Germ cell transplantation into X irradiated monkey testes.** *Hum Reprod*. 2002;**17** (1):55-62.

Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K: **Testicular stem cells for fertility preservation: Preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting.** *Pediatr Bl Can*, 2009, **53**:274-280.

Scofield V, Rao B, Broder S, Kennedy C, Wallace M, Graham B, Poiesz B: **HIV interaction with sperm.** *AIDS* 1994, **8**:1733-1736.

Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, George D, Murphy A, Valenzuela DM, Hobbs RM, Paolo PR. **Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors.** *Nature*, 2010, **449**:346–350.

Segretain D, Egloff M, Gerard N, Pineau C, Jégou B: **Receptor-mediated and absorptive endocytosis in male germ cells of different mammalian species.** *Cell Tissue Res* 1992, **268**:471-478.

Shehu-Xhilaga M, Kent S, Batten J, Ellis S, Van der Meulen J, O'Bryan M, Cameron PU, Lewin SR, Hedger MP: **The testis and epididymis are productively infected by SIV and SHIV in juvenile macaques during the post-acute stage of infection.** *Retrovirology* 2007, **4**:7.

Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Raboud JM, Pilon R, la Porte C, Ostrowski M, Loutfy M, Burger H, *et al*: **Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy.** *Aids* 2009, **23**:2050-2054.

Sheth PM, Yi TJ, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Osborne B, Pilon R, la Porte C, Ostrowski M, Mazzulli T, *et al*: **Mucosal correlates of isolated HIV semen shedding during effective antiretroviral therapy.***Mucosal Immunol* 2012.

Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster R.L: **Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells.** *Proc Nat Acad Sci*, 2000, **97**:8346–8351.

Thomas ER, Shotton C, Weiss RA, Clapham PR, McKnight A: **CD4-dependent and CD4-independent HIV-2: consequences for neutralization.***Aids* 2003, **17**:291-300.

Uchil PD, Mothes W: **HIV Entry Revisited.***Cell* 2009, **137**:402-404.

Van Pelt AMM, Morena AR, van Dissel EF, Boitani C *et al*. **Isolation of the Synchronized A Spermatogonia from Adult Vitamin A-Deficient Rat Testes** *Biol Reprod* 1996 **55**:439-444.

Van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG, van Dissel-Emiliani FM. **Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics.** *Endocrinology*. 2002;**143**(5): 1845-1850. (6):765-774.

Vidricaire G, Gauthier S, Tremblay MJ: **HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 Interactions but relies on heparan sulfate proteoglycans.***J Infect Dis* 2007, **195**:1461-1471.

Wang D, Li LB, Hou ZW, Kang XJ, Xie QD, Yu XJ, Ma MF, Ma BL, Wang ZS, Lei Y, Huang TH: **The integrated HIV-1 provirus in patient sperm chromosome and its transfer into the early embryo by fertilization.***PLoS One* 2011, **6**:e28586.

Ward E, De Santis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. **Childhood and adolescent cancer statistics**, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;**64**:83 – 103.

Whitney JB, Hraber PT, Luedemann C, Giorgi EE, Daniels MG, Bhattacharya T, Rao SS, Mascola JR, Nabel GJ, Korber BT, Letvin NL: **Genital tract sequestration of SIV following acute infection.***PLoS Pathog* 2011, **7**:e1001293.

Willey S, Roulet V, Reeves JD, Kergadallan ML, Thomas E, McKnight A, Jegou B, Dejucq-Rainsford N: **Human Leydig cells are productively infected by some HIV-2 and SIV strains but not by HIV-1.***Aids* 2003, **17**:183-188.

Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Wese F-X, Donnez J. **Spermatogonial survival after cryopreservation and shortterm orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice.** *Hum Reprod* 2007;**22**:1603 – 1611.

Wyns C, Van Langendonck A, Wese F-X, Donnez J, Curaba M. **Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue.** *Hum Reprod* 2008;**23**:2402 – 2414.

Yango P, Altman E, Smith JF, Klatsky PC, Tran ND: **Optimizing cryopreservation of human spermatogonial stem cells: comparing the effectiveness of testicular tissue and single cell suspension cryopreservation.***Fertil Steril*, 2014, 102:1491-1498.

Zhang HD, G. Beumont, M. Livornese, L Jr. Van Uitert, B. Henning, K. Pomerantz, R.J.: **Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy.***N Engl J Med* 1998, **339**:1803-1809.

ANEXOS

ANEXO I - Casuística das amostras obtidas de testículo e procedimentos realizados

Legenda: procedimento realizado (+) | procedimento não realizado (-)

	Paciente	Data	Idade	Diagnóstico	Congelamento	Cultura a fresco	Descongelamento
1	GFA001	27/02/2013	68	Ca próstata	+	-	+
2	NSS002	06/03/2013	71	Ca próstata	+	-	+
3	ACP003	27/03/2013	54	Ca próstata	+	+	+
4	PM18	06/09/2013	37	Suicídio	+	+	+
5	P158	10/09/2013		Ca próstata	+	+	-
6	P159	30/09/2013	76	Ca próstata	+	+	-
7	P160	01/10/2013	64	Ca próstata	+	+	-
8	P161	22/10/2013	44	Ca próstata	+	+	-
9	P162	31/10/2013		Ca próstata	+	+	-
10	PM19	31/10/2013	25	AVC	+	+	+
11	PM20	11/11/2013	28	Trauma	-	+	-
12	P163	03/12/2013	93	Ca próstata	+	+	-
13	P164	03/12/2013	85	Ca próstata	+	+	-
14	P165	20/01/2014	88	Ca próstata	+	+	-
15	PM21	13/02/2014	22	AVP	+	+	-
16	PM22	26/02/2014	65	Transplante fígado	+	+	-
17	PM23	23/03/2014			+	-	+
18	P167	10/04/2014	89	Ca próstata	+	-	-
19	P168	17/04/2014	69	Ca próstata	+	-	-
20	P169	12/05/2014	66	Orquiectomia urgência	+	+	-
21	PM24	19/5/2014	63	AVC	+	-	-
22	PM25	22/05/2014	45	AVC	+	+	+
23	PM26	24/06/2014	17	afogamento	+	+	-

Fonte: Elaborado pela autora.

ANEXO II – Composição do meio de cultura para cultivo primário de células germinativas (estudo separado em duas tabelas)

Suplementos do meio StemPro para o cultivo de células-tronco espermatozoais				
Reagentes	Solução estoque	Solvente	Quantidade/ 500 ml	Concentração final
Sólidos:	-	-		
Albumina Bovina	-	-	2,5 g	5 mg/ml
D(+) Glucose	-	-	3 g	6 mg/ml
ácido Ascórbico	-	-	8,8 mg	1x 10 ⁻⁴ M
Transferrina (apo)	-	-	50 mg	100 µg/ml
Piruvato de sódio	-	-	15 mg	30 mg/ml
d-Biotina	-	-	5 mg	10 µg/ml
Líquidos:				
2-beta Mercaptoethanol	-	-	1,7 µl	5x 10 ⁻⁵ M
DL-ácido láctico	-	-	500 µl	1 µl/ml
MEM-aminoácidos não essenciais	-	-	5 ml	10 µl/ml
Suplemento Stem Pro	-	-	13 ml	26 µl/ml
Insulina	10 mg/ml	-	1,25 ml	25 µg/ml
Selenito de sódio	0,25 mg/ml	milliQ	10 µl	30 nM
Putrescina	100 mg/ml	milliQ	50 µl	60 µM
L-Glutamina	200 mM	-	5 ml	2 mM
MEM solução vitaminas	-	-	5 ml	10 µl/ml
b-Estradiol	0,6 mg/ml	100% EtOH	25 µl	30 ng/ml
Progesterona	0,6 mg/ml	100% EtOH	50 µl	60 ng/ml

Fonte: Elaborado pela autora.

Suplementos para meio StemPro adicionados no momento de uso				
Reagentes	Solução estoque	Solvente	Quant/ 50 ml	Conc. final
Epidermal Growth Factor (EGF)	200 µg/ml	10 mM acetic acid/0,1% BSA	5 µl	20 ng/ml
Human basic Fibroblast Growth Factor (H bFGF)	10 µg/ml	PBS/0,1%BSA	50 µl	10 ng/ml
Leukemia Inhibitor Factor (LIF)	10 µg/ml	PBS/0,1%BSA	50 µl	10 ng/ml
Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)	10 µg/ml	PBS/0,1% BSA	50 µl	10 ng/ml
Fetal Calf Serum European (FCS)	-	-	0,5 ml	1%
Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strep)	-	-	0,25 ml	0,5%

Fonte: Elaborado pela autora.