



Diferenciação de gametas *in vitro* a partir de células-tronco

In vitro ES cell differentiation into gametes

J.A. Visintin¹, C.M. Mendes, M.D. Goissis, I. Kerkis

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

¹Correspondência: visintin@usp.br

Resumo

As células germinativas representam uma população de células especializadas. A separação entre as linhagens germinativa e somática ocorre no início do desenvolvimento embrionário, garantindo que modificações genéticas que ocorram durante o desenvolvimento não tenham efeito sobre a formação dos gametas e, desta forma, não sejam transmitidas para a próxima geração. Os gametas são células com uma missão importante: garantir a conservação e a preservação das espécies. O DNA haploide, resultado da gametogênese, será unido no processo de fecundação para a formação de um novo ser. Devido à sua importância, a gametogênese é um processo complexo e regulado, que o torna difícil de ser mimetizado *in vitro*. Ao longo da última década, vários grupos de pesquisa têm demonstrado que essas células da linhagem germinativa podem ser produzidas *in vitro* a partir de células-tronco pluripotentes. Embora ainda exista uma série de perguntas sem respostas, as pesquisas sugerem novas possibilidades de investigação sobre as células-tronco e sua aplicação na área da reprodução.

Palavras-chave: células-tronco, diferenciação, gametas, gametogênese.

Abstract

Germ cells present a specialized cell population. The separation between germ and somatic cell lines occur early in embryonic development, ensuring that any genetic modification that might happen throughout development is not transferred to the next generation. Gametes have an important role: assure conservation and preservation of species. Both haploid DNA resulting from gametogenesis will join at fertilization in order to form a new organism. Due to its importance, gametogenesis is a complex and tight regulated process, which makes it difficult to replicate in vitro. During the last decade, some research groups have demonstrated that germ cells can be produced in vitro from pluripotent embryonic stem cells. Although several questions remain unanswered, novel data suggest new possibilities for investigation on stem cells and its application on reproductive biology.

Keywords: differentiation, gametes, gametogenesis, stem cells.

Introdução

A diferenciação de células germinativas (GC, do inglês *germ cells*) em gametas é um processo altamente regulado *in vivo*. A totalidade dos mecanismos que controlam a diferenciação dessas células em gametas ainda é desconhecida. Isso impede a descoberta de algumas causas de infertilidade. A obtenção de um sistema *in vitro* de diferenciação de GC em gametas permitiria melhores condições para entender os mecanismos biológicos envolvidos e também, auxiliar no tratamento de infertilidade.

Células-tronco têm o potencial de diferenciação em um ou mais tipos de tecidos, portanto são candidatas à utilização em sistemas de produção de gametas *in vitro*. Como iremos discutir adiante, existem alguns tipos de células-tronco que podem ser utilizadas de diferentes maneiras na diferenciação *in vitro* de gametas. Existem grandes dificuldades para gerar gametas *in vitro* e também para comprovar a produção de gametas funcionais. Essa comprovação é a mais óbvia: gerar um indivíduo fértil, porém diversos fatores podem alterar a qualidade desses gametas e a obtenção de indivíduos saudáveis fica comprometida.

Estudos recentes obtiveram sucesso quando incluíram etapas realizadas *in vivo* no processo. Isso evidencia que a falta de conhecimento dos mecanismos impede a mimetização completa da gametogênese *in vitro*. Em contrapartida, estes estudos permitiram a geração de gametas a partir de células isoladas de um indivíduo, criando possibilidades para terapias e em produção animal, outra ferramenta para gerar animais transgênicos.



Especificação e diferenciação das células germinativas

As células germinativas têm origem na parede interna do saco vitelínico e são chamadas de células germinativas primordiais. Elas migram até próximo ao mesonefro, uma região ao lado dos rins embrionários, onde, com outras células, irão formar a gônada embrionária. Em um primeiro momento, as gônadas são sexualmente indiferentes.

Nos machos, há a expressão do gene *SRY* e do hormônio antimulleriano, os quais atuam na manutenção dos ductos mesonéfricos e na regressão dos ductos paramesonéfricos. Sob a influência da testosterona, as células de Sertoli promovem a deposição de uma membrana basal, formando os cordões testiculares que também abrigam as espermatogônias, dando origem aos futuros túbulos seminíferos (Parker e Schimmer, 2006).

Nas fêmeas não há formação da rede tubular a partir dos ductos mesonéfricos e há a manutenção dos ductos paramesonéfricos, que darão origem ao aparelho reprodutor feminino devido à ausência da expressão de *SRY*. O ovário mantém uma aparência indiferenciada até o aparecimento dos folículos primordiais (Parker e Schimmer, 2006). Após a puberdade, a produção de gametas é iniciada.

A espermatogênese envolve uma cascata de eventos, entre eles mitose, meiose, espermiogênese e espermição, que devem ocorrer precisamente e com a participação das células de Sertoli (Wong e Cheng, 2009). Milhões de espermatozoides são produzidos diariamente ao longo da vida adulta de um macho sadio graças à presença de células-tronco espermatogoniais (SSC – *spermatogonial stem cells*, em inglês). Toda vez que essas células se multiplicam, precisam decidir se formarão células-filhas indiferenciadas (autorrenovação) ou se iniciarão o processo de diferenciação, gerando os diferentes tipos de espermatogônias (Apareada, Aalinhada, A1-A4 e B), por meio de várias etapas que resultarão na amplificação do número de GC (Kostereva e Hofmann, 2008). Para que uma SSC progrida até um espermatozoide, é necessária a existência de um nicho, formado pela membrana basal, os componentes celulares e a matriz extracelular que formam um microambiente. Fatores externos afetam esse nicho, como, por exemplo, hormônios. Uma das células mais importantes nesse processo são as células de Sertoli, que vão produzir fatores de crescimento e ancorar todo o processo de manutenção da pluripotência e o processo de diferenciação (Kostereva e Hofmann, 2008).

Em relação às fêmeas, existe um dogma de que a oogênese só ocorre durante a vida fetal. Há grupos que acreditam na existência de células-tronco que, sob estímulos adequados, podem migrar para o ovário e produzir oócitos (Bukovsky et al., 2005). Após a puberdade, sob estímulos hormonais, os oócitos progridem na meiose até serem ovulados em metáfase II na maioria das espécies.

Célula-tronco

O organismo adulto de um mamífero é composto por diversos tipos celulares que compõem os diferentes tecidos. Esses diferentes tecidos possuem células do estroma e parênquima, incluindo células-tronco. Estas últimas são definidas pela sua dupla capacidade de proliferação e diferenciação. As células-tronco teciduais são as responsáveis por renovar os tecidos adultos ao se multiplicarem e gerarem células-filhas diferenciadas (Fuchs et al., 2004).

Entretanto, esse organismo multicelular origina-se de uma única célula, o zigoto, resultante da fertilização do oócito pelo espermatozoide. Esse zigoto tem o potencial de dar origem a um indivíduo completo. Para tanto, essa estrutura única se divide e forma os blastômeros, as células embrionárias que ainda retêm o mesmo potencial do zigoto e são classificadas como totipotentes. Em determinado momento do desenvolvimento, essas células deixam de ser totipotentes, devido a uma alteração na localização espacial combinada com mudanças na expressão dos genes.

No estágio embrionário de mórula, há grupos de células que se situam na camada externa e outro na camada interna. Quando há o desenvolvimento dessa mórula em blastocisto, dois grupos de células são facilmente distinguíveis, oriundos dos grupos celulares presentes na mórula. As células do trofocotoderma são as mais externas e darão origem à placenta e aos anexos embrionários. As células internas darão origem à chamada massa celular interna (MCI), que pode se diferenciar nos três folhetos germinativos: ectoderma, mesoderma e endoderma. Devido a tal propriedade, essas células são chamadas de pluripotentes (Wobus e Boheler, 2005).

As chamadas células-tronco embrionárias são obtidas após o isolamento da MCI de blastocistos. Em condições adequadas de cultivo *in vitro*, elas se proliferam mantendo sua pluripotência. A alteração das condições de cultivo permite a diferenciação dessas células, a qual pode ser induzida para o tipo celular desejado.

Durante a diferenciação de células pluripotentes *in vitro* ou *in vivo* há formação dos folhetos germinativos. Nesses folhetos, existem células-tronco que podem dar origem a diferentes tipos de tecidos, porém são limitadas dentro de sua linhagem germinativa, sendo chamadas de multipotentes (Wobus e Boheler, 2005). Por exemplo, uma célula-tronco do mesoderma pode dar origem às células musculares ou hematopoéticas, mas normalmente não dá origem a neurônios, oriundos do ectoderma, ou células do tecido glandular, oriundas do endoderma.

Durante o desenvolvimento, algumas células se diferenciam para originar apenas um tipo de tecido, ou seja, unipotente, sendo chamadas também de progenitoras. Como mencionado acima, dentro de um tecido



adulto, essas células são responsáveis pela renovação tecidual. Curiosamente, estudos mostram que células unipotentes *in vivo* podem obter propriedades pluripotentes *in vitro*, como relatado com células-tronco espermatogoniais (Kanatsu-Shinohara et al., 2005; Guan et al., 2006; Conrad et al., 2008).

Essa mudança de potencial da célula ilustra a plasticidade do genoma. Mais impactante é a indução de pluripotência em células somáticas terminantemente diferenciadas (iPSC; Takahashi e Yamanaka, 2006). Fibroblastos são transformados em células pluripotentes com fenótipo similar ao de células-tronco embrionárias após a introdução de fatores de transcrição específicos. Da mesma maneira, essas iPSC podem ser diferenciadas nos três tecidos da linhagem germinativa, tendo grande potencial de aplicação biomédica.

Diferenciação *in vitro*

A dificuldade dos estudos de obtenção de gametas *in vitro* a partir de células ES se deve ao fato de que os marcadores de muitas células germinativas primordiais (PGC - *primordial germ cells*, em inglês) são idênticos àqueles das células ES. Assim, é uma tarefa difícil separar PGC e células ES precocemente (Daley, 2007; Nagano, 2007; Nagy et al., 2008).

O primeiro estudo que obteve a produção de gameta feminino *in vitro* foi relatado por Hübner e colaboradores (Hübner et al., 2003). Os autores utilizaram células ES geneticamente modificadas que transportam um gene repórter Oct4. A formação de estruturas semelhantes a folículos ovarianos foi observada, assim como oócitos que expressavam Oct4. Essas células foram obtidas a partir de estruturas semelhantes a folículos após 3-4 semanas de cultura e também expressaram marcadores de genes meióticos (Dmc1 e Sycp3). Embora o potencial de desenvolvimento dessas estruturas parecidas com oócitos não tenha sido testado, estruturas semelhantes a blastocistos surgiram em cerca de seis semanas, o que indica a ativação partenogenética espontânea. Assim, este estudo sugere que tais estruturas derivadas de células ES têm potencial gametogênico *in vitro*.

Toyooka et al. (2003) relataram a derivação de GC do sexo masculino a partir de células ES de camundongo, utilizando uma abordagem diferente. Células ES que continham um gene MVH-repórter foram induzidas a formar corpos embrioides (EB, *embryoid bodies*, em inglês), que são estruturas obtidas *in vitro* com potencial semelhante a um embrião pré-implantacional, dentro do qual, entretanto, a diferenciação ocorre aleatoriamente. Em seguida, células MVH positivas foram purificadas e implantadas nos testículos de camundongos adultos. Essas células encontraram as condições adequadas para formar estruturas semelhantes aos túbulos seminíferos, os quais têm capacidade de suporte completo da espermatogênese para a produção de células espermáticas maduras.

Geijsen et al. (2004) mostraram o aparecimento espontâneo *in vitro* de PGC masculinas de camundongos a partir de células ES, após a indução da diferenciação dos EB. Os autores obtiveram células haploides e demonstraram que a injeção dessas células em óvulos resultou na formação de estruturas semelhantes aos blastocistos. Contudo, essas células não apresentaram morfologia de espermatozoides, e o desenvolvimento embrionário, após a injeção, não foi completo. Este estudo sugere que PGC masculinos obtidos a partir de células ES se tornaram espontaneamente células pós-meióticas, que são capazes de ativar os óvulos.

Recentemente, Nayernia et al. (2006) relataram não só a obtenção de gametas masculinos a partir de células ES, mas também a geração de proles. Primeiramente, os autores criaram uma linhagem celular ES para selecionar células-tronco espermatogoniais pela introdução de um gene promotor (Stra8) ligado a um gene repórter fluorescente (eGFP) e que se ativa no início da formação de GC masculinas. As células selecionadas já apresentavam características de GC masculinas prontas para entrar na fase inicial da meiose. Em seguida, essas células foram novamente selecionadas com a finalidade de se introduzir o gene promotor (Prm1) ligado a outro gene repórter fluorescente (dsRED), expresso em células haploides masculinas. Após a indução da diferenciação com ácido retinoico (AR), algumas células apresentaram motilidade. O aparecimento de células fluorescentes sugere a geração de células haploides que estão nas fases finais da espermatogênese, porém os espermatozoides gerados apresentavam morfologia anormal. Posteriormente, os espermatozoides obtidos foram injetados em óvulos. Como resultado, 65 embriões foram transferidos para receptoras pseudogestantes, nascendo sete filhotes vivos negativos para o gene repórter Prm1 e que aparentemente apresentaram anormalidades no crescimento, pois morreram pouco tempo após o nascimento. O presente estudo demonstra o potencial que as GC masculinas haploides derivadas de células ES murinas apresentam para ativar o oócito e suportar até o nascimento de prole viva. Sendo assim, este trabalho mostra a produção de gametas com algum tipo ainda desconhecido de falha; portanto, é importante que outros grupos obtenham sucesso na formação de gametas morfológica e funcionalmente normais e que possam resultar na obtenção de proles saudáveis.

Kerkis et al. (2007) obtiveram estruturas semelhantes aos oócitos e espermatozoides em uma mesma condição sem nenhum tipo de seleção ou manipulação genética. A diferenciação foi induzida pelo AR nos corpos embrioides em suspensão. Os espermatozoides obtidos foram morfológicamente semelhantes ao diferenciados *in vivo*. Também apresentaram marcação positiva para acrosina e tubulina acetilada. A presença de peça intermediária foi comprovada por microscopia eletrônica. A produção de animais viáveis a partir de gametas oriundos de células-tronco pluripotentes só foi possível após uma diferenciação em etapas, incluindo uma etapa *in vivo* (Hayashi et al., 2011, 2012). Células-tronco embrionárias ou iPSC murinas, carregando genes



repórteres fluorescentes para os genes *Blimp1* e *Dppa3*, foram induzidas a se diferenciarem em células germinativas primordiais (PGCs) com uso de diversos fatores de crescimento, incluindo BMP4 e LIF. Células que expressavam as proteínas fluorescentes foram selecionadas e transplantadas para testículos de animais depletados de células germinativas. Foi observado que houve colonização testicular e subsequente produção de espermatozoide que, quando utilizado na fecundação *in vitro*, resultou na produção de animais viáveis e férteis (Hayashi et al., 2011).

De maneira similar, oócitos foram produzidos a partir de ESC ou iPSC. A indução em PGCs e a seleção por proteínas repórteres fluorescentes foram feitas da mesma maneira como descrito acima. As células selecionadas foram agregadas com células somáticas gonadais embrionárias aos 12,5 dias de desenvolvimento. Esse aglomerado celular foi transplantado sob a bursa ovariana de camundongos fêmeas receptoras, e oócitos foram recuperados após três semanas. Após maturação e fecundação *in vitro*, animais saudáveis e férteis foram produzidos (Hayashi et al., 2012).

Uma alternativa à utilização de ESC ou iPSC na produção *in vitro* de gametas é o uso de células ou tecidos oriundos das próprias gônadas. Células-tronco espermatogoniais (SSC) responsáveis pela manutenção da espermatogênese podem ser isoladas e cultivadas *in vitro* (Kanatsu-Shinohara et al., 2005). Apesar de essas células serem capazes de colonizar testículos e produzir espermatozoides *in vivo*, a diferenciação completa delas *in vitro* não foi obtida com sucesso. O cocultivo de células testiculares com células de Sertoli em placas (Lee et al., 2001; Marh et al., 2003) ou estruturas tridimensionais (Lee et al., 2006, 2007) permitiu a ocorrência de meiose, porém apenas espermátides foram formadas.

Recentemente, a espermatogênese completa foi realizada *in vitro* pela primeira vez. Fragmentos de testículos de camundongos pré-púberes foram cultivados sobre gel de agarose embebidos em meio de cultivo, num método de interface ar-líquido. Desta maneira, foi possível gerar espermatozoides e progênie viáveis (Sato et al., 2011a). Utilizando o mesmo método, foi possível produzir espermatozoides a partir de SSCs. Testículos depletados de células germinativas foram injetados com SSC antes de fragmentados e submetidos ao cultivo em interface ar-líquido, produzindo espermatozoides viáveis (Sato et al., 2011b).

Diferentemente da espermatogênese, a oôgenese seria restrita ao período pré-natal, gerando uma reserva oocitária definida e limitada (Peters, 1970). Em estudos desafiando paradigmas, foi proposto que ovários possuem células-tronco germinativas. Essas células, denominadas células-tronco oogoniais, são isoladas pela presença da proteína DDX4 e, quando transplantadas em ovários receptores, dão origem a novos oócitos em camundongos (Zou et al., 2009) e humanos (White et al., 2012). Ainda são necessários estudos para verificar o potencial dessas células em produzir oócitos capazes de gerar indivíduos saudáveis. Isto se torna mais importante devido à evidência experimental contra a existência dessas células (Zhang et al., 2012), contribuindo ainda mais para o ceticismo da comunidade científica frente a essas células.

Considerações finais

A maturidade dos gametas diferenciados *in vitro* é ainda questionada. Os gametas não foram até então desafiados a um processo de fecundação normal, que é muito complexo. A motilidade dos espermatozoides ainda não foi observada.

Diferenciar totalmente *in vitro* as células pluripotentes constitui até hoje um processo com baixa eficiência. Raros gametas são gerados, mesmo em diferentes condições de cultivo. Mesmo assim, informações importantes já foram alcançadas (mais discutido em Kerkis et al., 2011).

Para melhor compreender as etapas, o processo está sendo parcialmente realizado *in vitro*. O comprometimento da diferenciação das células com a linhagem germinativa parece funcionar bem, no entanto os melhores resultados, inclusive com prole sadia, foram obtidos após a transferência das PGCs para testículos ou ovários.

Esses experimentos são importantes para que se possa entender melhor a formação dos gametas, melhorar as técnicas de reprodução assistida, testar novos medicamentos etc. Na produção animal, pode ser uma ferramenta muito útil para a transgenia animal.

Referências

- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala ME, Dominguez R.** Oogenesis in adult mammals, including humans. *Endocrine*, v.26, p.301-316, 2005.
- Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T.** Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*, v.456, p.344-349, 2008.
- Daley GQ.** Gametes from embryonic stem cells: a cup half empty of half full? *Science*, v.316, pp.409-410, 2007.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G.** Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, v.116, p.769-778, 2004.
- Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ.** Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, v.427, p.148-154, 2004.



- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, v.440, p.1199-1203, 2006.
- Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, v.338, p.971-975, 2012.
- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, v.146, p.519-532, 2011.
- Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF III, Boiani M, Scholer HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, v.300, p.1251-1256, 2003.
- Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod*, v.72, p.985-991, 2005.
- Kerkis I, Fonseca SAS, Serafim RC, Lavagnolli TM, Abdelmassih S, Abdelmassih R, Kerkis A. *In vitro* differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.535-548, 2007.
- Kerkis I, Mendes CM, Fonseca SAS, Lizier NF, Serafim RC, Kerkis A. Actual achievements on germ cells and gametes derived from pluripotent stem cells, embryonic stem cells. In: Atwood C (Ed.). *Recent advances in pluripotent stem cell-based regenerative medicine*. 2011. Available on: <http://www.intechopen.com/books/embryonic-stem-cells-recent-advances-in-pluripotent-stem-cell-based-regenerative-medicine/actual-achievements-on-germ-cells-and-gametes-derived-from-pluripotent-stem-cells>.
- Kostereva N, Hofmann MC. Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reprod Domest Anim*, v.43, suppl.2, p.386-392, 2008.
- Lee DR, Kaproth MT, Parks JE. In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. *Biol Reprod*, v.65, p.873-878, 2001.
- Lee JH, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park DW, Lee SJ, Min CK. *In vitro* differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril*, v.87, p.824-833, 2007.
- Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC. *In vitro* spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials*, v.27, p.2845-2853, 2006.
- Marh J, Tres LL, Yamazaki Y, Yanagimachi R, Kierszenbaum AL. Mouse round spermatids developed in vitro from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in vivo-developed mature oocytes. *Biol Reprod*, v.69, p.169-176, 2003.
- Nagano MC. *In vitro* gamete derivation from pluripotent stem cells: progress and perspective. *Biol Reprod*, v.76, p.546-551, 2007.
- Nagy ZP, Kerkis I, Chang CC. Development of artificial gametes. *Reprod BioMed Online*, v.16, p.539-544, 2008.
- Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A, Engel W. *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell*, v.11, p.125-132, 2006.
- Parker KL, Schimmer BP. Embryology and genetics of the mammalian gonads and ducts. In: Neill JD (Ed.). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. London: Elsevier Academic Press, 2006. p.313-336.
- Peters H. Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.259, p.91-101, 1970.
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, v.471, p.504-507, 2011a.
- Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T. *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun*, v.2, p.472, 2011b.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v.126, p.663-676, 2006.
- Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.100, p.11457-11462, 2003.
- White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med*, v.18, p.413-421, 2012.
- Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*, v.85, p.635-678 2005.
- Wong EWP, Cheng CY. Polarity proteins and cell-cell interactions in the testis. *Int Rev Cell Mol Biol*, v.278, p.309-353, 2009.
- Zhang H, Zheng W, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, Liu K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.109, p.12580-12585, 2012.
- Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, Xiang J, Shi L, Yu Q, Zhang Y, Hou R, Wu J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*, v.11, p.631-636, 2009.