



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ISOLAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
ESPERMATOGÔNIA TRONCO DE *Pseudopimelodus*
mangurus E ANÁLISES PRELIMINARES DE
CICLOSPORINA A COMO IMUNOSSUPRESSOR EM
RECEPTORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS

GISELLE PESSANHA PESSOA

Mestranda no curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas
(Zoologia)

Botucatu – SP
2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita
Filho” INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**ISOLAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
ESPERMATOGÔNIA TRONCO DE *Pseudopimelodus
mangurus* E ANÁLISES PRELIMINARES DE
CICLOSPORINA A COMO IMUNOSSUPRESSOR EM
RECEPTORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS**

GISELLE PESSANHA PESSOA

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Sérgio Monzani

Coorientador:

Prof. Dr. José Augusto Senhorini

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Unesp - *Campus* de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

**Botucatu –
SP 2023**

P475i

Pessoa, Giselle Pessanha

Isolamento e criopreservação de espermatogônia tronco de *Pseudopimelodus mangurus* e análises preliminares de ciclosporina A como imunossupressor em receptores de células germinativas / Giselle Pessanha Pessoa. -- Botucatu, 2023
98 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Paulo Sérgio Monzani

Coorientador: José Augusto Senhorini

1. Conservação. 2. Quimera germinativa. 3. Busulfan. 4. Ciclosporina A. 5. Manipulação cromossômica. [Clique aqui para acessar o documento](#)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao inesquecível Senhor Jesus Cristo, por ser a luz da minha vida,

Agradeço à minha querida família – em especial, à minha mãe, Márcia Valéria, minha verdadeira flor de aço, ao meu pai, Floriano, minha fortaleza insubstituível, e aos meus irmãos Gabriel, Livia e Samara, as cores mais alegres da minha vida – por ser a minha base,

Agradeço à minha amiga Jenyffer, por colorir minha jornada todos os dias com sua preciosa amizade,

Agradeço ao meu namorado, por ser meu melhor amigo e me permitir conhecer o verdadeiro amor, e por poder compartilhar minha vida ao seu lado,

Agradeço à AES Tietê pela bolsa, que me permitiu dois anos de formação acadêmica diferenciada e de qualidade,

Agradeço aos membros do Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Unesp Botucatu pelo excelente suporte e pronto atendimento,

Agradeço aos membros da banca, pela disponibilidade e pelo interesse em meu trabalho,

Agradeço ao meu orientador, Paulo Sérgio Monzani, pela paciência, pelo carinho e por ter apoiado, guiado, lido tantas vezes e melhorado meu trabalho,

Agradeço ao coordenador George Shigueki Yasui e ao meu coorientador, José Augusto Senhorini, pela confiança e por me acolher no Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA/ICMBio,

Agradeço também a toda a equipe do CEPTA/ICMBio: Lucia, Amanda, Gabriella, Andreoli, Jenyffer, bem como todo o corpo técnico e administrativo, pela convivência, pela ajuda essencial, e por tantos ensinamentos,

Sem vocês, essa conquista jamais seria possível. Meu coração é repleto de gratidão. Um abraço muito carinhoso a todos!

RESUMO

A região Neotropical abriga a maior diversidade de peixes continentais do mundo, grande parte descrita em território brasileiro. Aproximadamente 10% dessa ictiofauna está ameaçada de extinção, principalmente devido a ações antrópicas. Diversas áreas do conhecimento têm voltado a atenção para a conservação da biodiversidade aquática, como o transplante interespecífico de células germinativas. Esta técnica permite que uma espécie de peixe produza gametas de outra espécie, podendo atuar na conservação de peixes ameaçados de extinção. *Pseudopimelodus mangurus* (Siluriformes) foi utilizado para estudo como doador de espermatogônias-tronco e *Astyanax altiparanae* (Characiformes) como receptor. As espermatogônias-tronco de *P. mangurus* foram obtidas pela associação das técnicas de dissociação enzimática, gradiente de densidade de Percoll e plaqueamento diferencial. A pureza de espermatogônias-tronco após o plaqueamento diferencial foi de $60,14\% \pm 2,93\%$, sendo 6% maior que no gradiente de densidade de Percoll. A análise da expressão relativa de *ddx4* e da atividade da fosfatase alcalina em espermatogônias-tronco evidenciaram suas características de células tronco. As espermatogônias-tronco foram criopreservadas utilizando cinco 5 crioprotetores, em três molaridades distintas. O propanediol a 1 M melhor preservou a integridade e viabilidade celular. Os receptores de *A. altiparanae* foram produzidos pela combinação das técnicas de manipulação cromossômica e esterilização química com busulfan, sendo obtida a depleção da espermatogênese. Leucócitos de *A. altiparanae* foram cultivados *in vitro* nas concentrações 0,1, 0,15 e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ciclosporina A (CsA). A viabilidade e concentração dos leucócitos diminuíram nas 24 e 48 h do cultivo, sendo que a menor concentração de CsA resultou na maior viabilidade leucocitária. Na avaliação da CsA *in vivo* foram utilizados juvenis triploides de *A. altiparanae* separados nos seguintes grupos, (i) não esterilizados com busulfan, (ii) esterilizados com busulfan, (iii) esterilizados e injetados com emulsão, (iv) esterilizados e injetados com 20 mg/kg de CsA e (v) esterilizados e injetados com 40 mg/kg de CsA. As amostras foram submetidas às análises histológicas do rim cranial e gônada, de expressão da *interleucina-1 β* (IL-1 β) em rim cranial e contagem de leucócitos por esfregaço sanguíneo, anterior a aplicação de CsA e aos 5 e 10 dias após. Não houve diferença quanto aos aspectos histológicos de rim cranial ou das gônadas entre os grupos. A expressão de IL-1 β foi diminuída nos rins dos animais administrados com CsA em ambas concentrações. A administração de CsA diminuiu o número de células brancas no sangue e conduziu a anemia nos animais. O uso de imunossupressor pode melhorar a eficiência do transplante interespecífico de espermatogônias em ações de conservação.

Palavras chave: Ciclosporina A, quimera germinativa, busulfan, conservação, esterilização química e manipulação cromossômica.

ABSTRACT

The Neotropical region has the greatest fish diversity of continental waters in the world, and most of it is described in Brazilian territory. Approximately 10% of this ichthyofauna is endangered by extinction, mainly due to anthropic actions. Several areas of knowledge have turned their attention to aquatic biodiversity conservation techniques, such as the interspecific transplantation of germ cells. This technique allows one species of fish to produce gametes of another species, which can act in the conservation of endangered fish. *Pseudopimelodus mangurus* (Siluriformes) was used to study as a spermatogonial stem cell donor, and *Astyanax altiparanae* (Characiformes) was used as a recipient. *P. mangurus* spermatogonial stem cells were obtained by enzyme dissociation, Percoll density gradient, and differential plating techniques. The *ddx4* relative expression and the activity of alkaline phosphatase analysis in spermatogonia stem showed their characteristics of stem cells. Spermatogonia stem cells were cryopreserved using five cryoprotectants in three different molarities. Propanediol (1 M) was the best cryoprotectant to preserve cell integrity and viability. *A. altiparanae* recipients were produced using chromosomal manipulation and chemical sterilization with busulfan, as previously reported, and the results showed spermatogenesis depletion. *A. altiparanae* leukocytes were cultured *in vitro* at 0.1, 0.15, and 0.2 µg/µL cyclosporin A (CsA) concentrations. Leukocyte viability and concentration decreased at 24 and 48 hours of culture, and the lowest concentration of CsA resulted in the highest leukocyte viability. Juvenile *A. altiparanae* triploids were used to evaluate CsA *in vivo* into the following groups: (i) nonsterilized with busulfan, (ii) sterilized with busulfan, (iii) sterilized and emulsion injected, (iv) sterilized and injected with 20 mg/kg of CsA and (v) sterilized and injected with 40 mg/kg of CsA. The samples were analyzed by histology of the cranial kidney and gonads, expression of interleukin-1β (IL-1β) in the cranial kidney, and leukocyte count by blood smear before the application of CsA and at 5 and 10 days after. There was no difference between the groups concerning histological aspects of the cranial kidney or the gonads. IL-1β expression was decreased in the kidneys of animals administered CsA at both concentrations. Administration of CsA decreased the number of white blood cells and led to anemia in the animals. The use of immunosuppressants can improve the efficiency of interspecific spermatogonial transplantation in conservation actions.

Keywords: Cyclosporin A, germline chimera, busulfan, conservation, chemical sterilization, and chromosomal manipulation.

Sumário

RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
1. Introdução	14
1.1. Células germinativas Primordiais - PGCs	15
1.2. Células germinativas – espermatogônias e oogônias-tronco	16
1.3. Receptores de células da linhagem germinativa	18
1.4. Resposta imunológica ao transplante	19
1.5. Criopreservação de células da linhagem germinativa	22
1.6. Visão geral do estudo	23
2. Objetivos	24
2.1. Geral	24
2.2. Específicos	25
3. Coletas e uso animal em experimentação	25
Capítulo 1. Isolamento, caracterização e criopreservação de espermatogônias-tronco de <i>Pseudopimelodus mangurus</i>	26
Resumo	26
4. Materiais e métodos	27
4.1. Análise da composição histológica do testículo de <i>P. mangurus</i>	27
4.2. Isolamento de espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	28
4.3. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina em espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	32
4.4. Avaliação da expressão do gene <i>ddx4</i> (<i>vasa</i>) em testículo e amostras provenientes das etapas de purificação de espermatogônia-tronco	33
4.4.1. Extração de RNA de amostras gonadal e espermatogoniais de <i>P. mangurus</i>	33
4.4.2. Produção de cDNA a partir do RNA de amostras gonadal e espermatogoniais de <i>P. mangurus</i>	34
4.4.3. Avaliação da expressão de <i>ddx4</i> por PCR convencional	34
4.4.4. Avaliação da expressão relativa de <i>ddx4</i>	36
4.5. Avaliação da melhor condição de criopreservação de espermatogônias-tronco	36
4.5.1. Criopreservação de espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	36
4.5.2. Descongelamento das espermatogônias e aferimento da viabilidade celular	38

4.5.3. Análises estatísticas	38
5. Resultados	38
5.1. Análise histológica do testículo de <i>P. mangurus</i>	38
5.2. Isolamento de espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	41
5.3. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina em espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	44
5.4. Avaliação da expressão de <i>ddx4</i> por PCR convencional nas amostras espermatogoniais de <i>P. mangurus</i>	45
5.5. Avaliação da expressão relativa de <i>ddx4</i> por PCR em tempo real em amostras de purificação de espermatogônias de <i>P. mangurus</i>	45
5.6. Criopreservação de espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	48
6. Discussão	49
6.1. Análise histológica do testículo de <i>P. mangurus</i>	49
6.2. Isolamento de espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	49
6.3. Caracterização das espermatogônias-tronco de <i>P. mangurus</i>	50
6.4. Criopreservação de espermatogônias tronco de <i>P. mangurus</i>	51
7. Conclusão	52
Capítulo 2. Esterilização química e imunossupressão de <i>Astyanax altiparanae</i> triploides	54
Resumo	54
8. Materiais e Métodos	55
8.1. Indução à triploidização em <i>A. altiparanae</i>	55
8.2. Esterilização química de juvenis triploides de <i>A. altiparanae</i>	56
8.3. Isolamento de leucócitos de <i>A. altiparanae</i>	57
8.4. Cultura <i>in vitro</i> de leucócitos com CsA	58
8.4.1. Viabilidade celular após a administração <i>in vitro</i> de CsA	59
8.4.2. Análises estatísticas	59
8.5. Administração <i>in vivo</i> de CsA em juvenis triploides de <i>A. altiparanae</i>	59
8.6. Avaliação da expressão da <i>interleucina-1β</i> em rins de animais tratados com CsA	62
8.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA de amostras de rim cranial de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA	62
8.6.2. Análise da expressão da <i>interleucina-1β</i> em rins craniais de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA – PCR convencional	62
8.6.3. Análise da expressão da <i>interleucina-1β</i> em rins craniais de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA – qPCR	63
9. Resultados	63
9.1. Tratamento de juvenis triploides de <i>A. altiparanae</i> com busulfan	63

9.2. Cultura <i>in vitro</i> de leucócitos de <i>A. altiparanae</i>	68
9.3. Análise histológica dos rins de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA	70
9.4. Esfregaço sanguíneo	72
9.5. Análise da expressão de <i>interlucina-1β</i> em rins craniais de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA – PCR convencional	75
9.6. Análise da expressão de <i>interlucina-1β</i> em rins craniais de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA – qPCR	76
10. Discussão	79
10.1. Esterilização química de juvenis triploides de <i>A. altiparanae</i>	79
10.2. Cultura <i>in vitro</i> de leucócitos de <i>A. altiparanae</i>	79
10.3. Análise histológica dos rins de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA	79
10.4. Esfregaço sanguíneo	80
10.5. Análise da expressão de <i>interlucina-1β</i> em rins craniais de <i>A. altiparanae</i> tratados com CsA	82
11. Conclusão	83
12. Perspectivas	85
13. Referências bibliográficas	86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Medidas dos espécimes machos de *P. mangurus* utilizados no isolamento de espermatogônias-tronco.....28

Tabela 2. Sequências de primers utilizados na avaliação dos genes endógenos e de interesse por PCR convencional e em tempo real.....35

Tabela 3. Avaliação da viabilidade e pureza de espermatogônias-tronco nas etapas de purificação.....44

Tabela 4. Viabilidade de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*, oriundas da etapa de purificação do gradiente de densidade de Percoll, para os cinco crioprotetores em três concentrações molares.....48

CAPÍTULO II

Tabela 5. Sequências de primers utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR convencional e em tempo real.....63

Tabela 6. Concentrações (ng/μL) e determinações de pureza (A260.280) de RNAs de rim cranial coletados nos dias 0, 5 e 10 do experimento.....75

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Figura ilustrativa da ativação e inibição da transcrição de *interleucina-2* (*IL-2*) e outras citocinas. Na parte superior da figura é indicada a via de ativação da transcrição de citocinas. Inicialmente, a calcineurina (PDB:4OR9) se liga ao fator nuclear das células T ativadas em sua forma fosforilada (NFAT-P) e catalisa a desfosforilação (NFAT) (PDB:2JOG), permitindo a migração de NFAT para o núcleo e ativando a transcrição de *IL-2* e outras citocinas. Na parte inferior da figura é indicada a via de inibição da transcrição de citocinas. A ciclofilina é ligada a CsA, e este complexo se liga à calcineurina (PDB:1MF8) impedindo a desfosforilação de NFAT-P. Este fator de transcrição fosforilado não migra para o núcleo e a transcrição de citocinas é reprimida.....21

CAPÍTULO I

Figura 2. Medida dos comprimentos total e padrão (A); Excisão gonadal (B) (pontilhado) e gônada excisada de macho de *P. mangurus* (C).....29

Figura 3. Representação ilustrativa do procedimento de isolamento e purificação de espermatogônias-tronco de *Pseudopimelodus mangurus*.....32

Figura 4. Histologia dos testículos de *P. mangurus*. **A e B:** Cortes histológicos da parte cranial do testículo que contém as franjas filiformes, sendo observado ninhos predominantes de espermatogônias (Sg), seguido de espermatócitos (Sp). **C e D:** Corte histológico da parte média do testículo, sendo **C e D** franjas filiformes com transição entre ninhos com espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sp) e espermatídes (St); estrela: tecido conjuntivo; asterisco: tecido intersticial. **E e F:** porção secretora da parte final do testículo, com projeções digitiformes secretoras (P). **G:** parte estruturada por tecido conjuntivo (asterisco), contendo o lúmen do ducto seminífero (triângulo) na região cranial do testículo **A, C, E e G:** Escala de 50 µm. **B, D e H:** Escala de 200 µm.....41

Figura 5. Fracionamento das células testiculares de *Pseudopimelodus mangurus* por gradiente de densidade de Percoll. **A:** banda de 10% de Percoll apresentando “debris” celulares e possíveis células somáticas. **B:** banda de 20% de Percoll. **C:** banda de 30% de Percoll. Nas bandas de 20% e 30% de Percoll foram obtidas as maiores concentrações de espermatogônias (Sg) em relação a espermatócitos (Sp) e espermatozoides (Sz). **D:** pellet predominando hemácias. **A e C:** escala de 50 µm. **B e D:** escala de 100 µm.....42

Figura 6. Imagens dos tipos celulares encontrados após a etapa de purificação pelo plaqueamento diferencial. Sg: espermatogônia; Sp: espermatócito; Sz: espermatozoide. Escala: 50 µm.....43

Figura 7. Imagem de microscopia de fluorescência e luz branca de

espermatogônias-tronco de *P. mangurus* na etapa de avaliação da atividade da fosfatase alcalina. **A:** espermatogônias-tronco oriundas do gradiente de densidade de Percoll fortemente fluorescentes. **B:** mesma imagem de **A** sob luz branca. **C:** espermatogônias-tronco oriundas do plaqueamento diferencial apresentando intensa fluorescência. **D:** mesma imagem de **C** sob luz branca. Escala: 100 μm44

Figura 8. Gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de *ddx4* e *rRNA 18S* das amostras de testículo (1), células oriundas do gradiente de densidade de Percoll (2) e do plaqueamento diferencial (3). **L:** ladder 1 kb plus.....45

Figura 9. Curva da curva padrão da β -actina. **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.....46

Figura 10. Curva da curva padrão de *ddx4*. **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.....46

Figura 11. Gráfico da curva de Melt para os pontos das curvas padrões para β -actina (**A**) e *ddx4* (**B**). No último ponto da curva de Melt, correspondente a 24 ng de cDNA e Ct 32 na curva de amplificação, pode ser notado um pico de pequena amplitude na temperatura de 74°C, indicando uma pequena formação de dímero (**B**).....47

Figura 12. Expressão relativa de *ddx4* nas amostras de testículo, gradiente de densidade de Percoll e plaqueamento diferencial. A expressão relativa referente ao plaqueamento diferencial pode estar superestimada devido a formação de dímeros de primers na reação de amplificação.....47

CAPÍTULO II

Figura 13. Botão leucocitário isolado da solução sanguínea.....58

Figura 14. Representação ilustrativa do experimento de administração *in vivo* de CsA em juvenis de *A. altiparanae* triploides esterilizados quimicamente. Imagem montada no programa BioRender.....61

Figura 15. Histologia dos testículos de *A. altiparanae* triploides submetidos à esterilização química com busulfan a 50 mg/kg. **A:** testículo antes do aumento de temperatura, com ninhos contendo algumas espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sp) predominantes, espermátides (St), conectados com o lúmen (triângulo) do túbulo seminífero sem espermatozóides. **B:** testículo uma semana após o aumento de temperatura. **C:** testículo uma semana após a primeira aplicação de busulfan. **D:** testículo uma semana após a segunda aplicação de busulfan. **E:** testículo uma semana após a terceira aplicação de busulfan. **A e B:** escala: 50 μm . **C, D e E:** 100 μm65

Figura 16. Histologia dos testículos de *A. altiparanae* triploides submetidos à esterilização

química com busulfan a 50 mg/kg, não tratado e tratado com CsA. **A:** testículo de indivíduo esterilizado quimicamente sem ser administrado CsA. **B:** testículo de indivíduo esterilizado quimicamente, cinco dias após a administração de 40 mg/kg de CsA. Escala de 100 μm67

Figura 17. Gráficos de viabilidades e concentrações leucocitárias sob diferentes concentrações de CsA *in vitro*. À esquerda, viabilidades celulares (%) 24 h e 48 h após o cultivo de leucócitos sob as diferentes concentrações de CsA (0,1, 0,15, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e do grupo controle sem CsA. À direita, concentrações leucocitárias 24 e 48 h após a cultura *in vitro* com CsA (0,1, 0,15, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e do grupo controle sem CsA. Embaixo, a resposta do número de leucócitos em função do tratamento de CsA, em regressão linear.....69

Figura 18: Lâmina histológica de rim cranial de *Astyanax altiparanae* triploides sem CsA. **A, C e E:** Tecido hematopoiético de controle sem emulsão, controle com emulsão e com CsA (40 mg/kg do dia 5), respectivamente, com sinusoide (cabeça de seta) e aglomerado de hemácias (h), revestido por células inter-renais cúbicas (seta cheia). Centros melanomacrofágicos (círculo pontilhado) e célula compatível com célula reticular (cr) em meio às células inter-renais do tecido hematopoiético do rim cranial. **B, D e F:** estroma renal no rim cranial de *A. altiparanae* de controle sem emulsão, controle com emulsão e com CsA (40 mg/kg do dia 5), respectivamente, com túbulo contorcido proximal (asterisco) com células epiteliais simples (seta vazia) e linfócitos (seta cheia). Escala de 50 μm71

Figura 19. Efeito do tratamento com CsA em *A. altiparanae* dos dias 0 (controles sem qualquer aplicação), 5 e 10 (controle com veículo de emulsão e tratamento com CsA) sobre as proporções dos tipos leucocitários no esfregaço sanguíneo.....73

Figura 20. Esfregaços sanguíneos oriundos dos diferentes tratamentos do experimento de administração *in vivo* de CsA, submetidos ao leucograma. **A:** Seta branca: granulócito. **B:** Seta branca: eosinófilo. **C:** Seta vazia: neutrófilo. **D:** Cabeça de seta: monócito. **E:** Seta azul: linfócito. Escala de 200 μm74

Figura 21. Expressão da *interleucina-1 β* e do endógeno *rRNA 18S* em rim cranial de *A. altiparanae* triploides submetidos ao experimento de imunossupressão com CsA. **L:** ladder 1 kb plus. **1:** grupo controle 3n sem busulfan no início do experimento (dia 0). **2:** grupo controle 3n com busulfan no dia 0. **3:** grupo controle 3n com emulsão 2 do dia 10. **4:** grupo 3n com tratamento de 20 mg/kg de CsA no dia 5. **5:** grupo 3n com tratamento de 20 mg/kg de CsA no dia 10. **6:** grupo 3n com tratamento de 40 mg/kg no dia 5. **7:** grupo 3n com tratamento de 40 mg/kg no dia 10.....76

Figura 22. Curva da curva padrão da β -actina. **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.....76

Figura 23. Curva da curva padrão do *interleucina-1 β* . **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.....77

Figura 24. Gráfico da curva de Melt para os pontos das curvas padrões para β -actina (A) e interleucina-1 β (B). No último ponto da curva de Melt, correspondente a 24 ng de cDNA e Ct 31,5 na curva de amplificação, pode ser notado um pico de pequena amplitude na temperatura de 76°C, indicando uma pequena formação de dímero (B). As setas indicam o último ponto da curva retirado da análise e as amostras controles sem e com tratamento de busulfan, também retirados da análise.....78

Figura 25. Gráfico da expressão relativa de *interleucina-1 β* nas amostras: controle tratado com emulsão 10 dias após a aplicação, controle tratado com busulfan, tratamento com CsA a 20 mg/kg cinco dias após a aplicação, tratamento com CsA a 20 mg/kg dez dias após a aplicação, tratamento com CsA a 40 mg/kg cinco dias após a aplicação e tratamento com CsA a 40 mg/kg dez dias após a aplicação.....78

1. Introdução

Atualmente, existem cerca de 34.200 espécies de peixes descritas, o que compreende mais da metade de todos os vertebrados existentes (BOTERO et al., 2021; BOUWMEESTER et al., 2022; FISHBASE, 2022). A região Neotropical apresenta a maior diversidade de espécies de peixes de água continental (AGOSTINHO et al., 2005), incluindo o maior número de espécies de água doce do mundo, sendo 4.475 descritas somente no Brasil (AGOSTINHO, 2005; ICMBio, 2018; CARVALHO & TEJERINA-GARRO, 2019; FISHBASE, 2022). Essa alta diversidade implica em interações complexas entre as espécies e o ambiente e, portanto, muitas espécies podem estar mais susceptíveis a alterações externas.

O Brasil apresenta um cenário alarmante, com 9,9% das espécies de peixes continentais (312 espécies) listadas em diferentes graus de ameaça de extinção (ICMBio, 2018). Nesta avaliação, 410 espécies de peixes marinhos e de água doce, 9,1% das espécies avaliadas, foram consideradas ameaçadas. No entanto, na última publicação do Ministério do Meio Ambiente (Portaria MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022), 388 espécies de peixes foram listadas como ameaçadas, apresentando um leve decréscimo em relação à última avaliação.

As principais ameaças à biodiversidade dos ecossistemas aquáticos continentais são a poluição e a eutrofização de mananciais, bem como desmatamento de matas ciliares e consecutivo assoreamento dos rios, alterações nos cursos naturais dos rios por construções de barragens, sobrepesca e introdução de espécies exóticas (CARVALHO & TEJERINA-GARRO, 2019). Diante desse quadro e das predições sobre impactos ambientais, em crescente evidência há pelo menos cinco décadas (PURDY, 2018), diferentes áreas do conhecimento têm atuado em sinergia na conservação da biodiversidade para direcionar ações de reconstituição de espécies em risco de extinção em seus ambientes naturais (MAHJI et al., 2014; SHIGUEMOTO, 2020).

Uma das abordagens mais destacáveis para a conservação da ictiofauna é a aplicação da biotecnologia reprodutiva em peixes (OKUTSU et al, 2006), que permite, por exemplo, a criação de bancos genéticos como medida de preservação da variabilidade genética, e o transplante interespecífico de células da linhagem germinativa (COELHO, 2021).

1.1. Células germinativas Primordiais - PGCs

As células germinativas primordiais (PGCs, do inglês *primordial germ cells*) são células precursoras embrionárias da linhagem germinativa e de interesse na biotecnologia para a conservação da ictiofauna. Em muitos animais, as PGCs podem ser identificadas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (NAGAI et al., 2001). Em algumas espécies de peixes estudadas, essas células se segregam nas primeiras divisões do embrião carregando elementos determinantes de PGCs (BONTEMS et al., 2009; SKUGOR et al., 2013; YON & AKBULUT, 2015). Esse tipo celular se segrega da linhagem somática e migra durante o desenvolvimento embrionário para a região da crista gonadal, região precursora das gônadas, guiadas por sinais quimiotáticos e movimentos amebóides ativos (YON & AKBULUT, 2015; OLGUIN-OLGUIN et al., 2021), nos primeiros estágios embrionários (NAGAI et al., 2001; CANTÚ & LAIRD, 2017).

As PGCs dispõem de um germoplasma especializado, de herança maternal, constituída por RNA citoplasmático codificante e não codificante e proteínas ligadas ao RNA. Entre esses elementos conhecidos pela literatura, tem-se as proteínas citoplasmáticas, tais como Nanos (KOPRUNNER et al. 2001) e Bucky ball (CAMPBELL et al., 2015), que são conservadas mesmo em organismos filogeneticamente distantes.

Os genes *nanos3*, um dos três genes homólogos de *nanos*, e *buc* (proteína Bucky ball) são expressos nas células germinativas e desempenham papéis essenciais na segregação da linhagem germinativa durante a embriogênese, bem como nos seus desenvolvimento, organização, migração e manutenção celulares (KOPRUNNER et al., 2001; BONTEMS et al., 2009; SUZUKI et al., 2010; RIEMER et al., 2015). *Nanos3* mantém a linhagem germinativa, assegurando a sua condição indiferenciada e protegendo as PGCs de apoptose durante a migração (LOLICATO et al., 2008; SUZUKI et al., 2008). Bucky ball, por sua vez, é responsável pelo recrutamento de germoplasma formado nos sulcos de clivagem embrionária e padronização dorsoventral do embrião (CAMPBELL et al., 2015).

Além destas proteínas, as PGCs apresentam várias outras proteínas específicas que desempenham funções essenciais para as PGCs, tais como CXCR4b e SDF1 que estão envolvidas no processo de migração de PGCs (BARTON; LEBLANC; LEHMANN, 2016), DND1 está envolvida com manutenção e sobrevivência de PGCs (YAMAJI et

al, 2017), DAZL envolvida na estabilização de mRNAs específicos de PGC (TAKEDA et al., 2009) e DDX4 (*vasa*) que tem função na migração e proliferação de PGCs (RAZ & REICHMAN-FRIED, 2006; KISTLER et al., 2018).

Os genes referentes às proteínas supracitadas são frequentemente empregados como marcadores desses elementos do germoplasma, permitindo o rastreamento do início da linhagem celular germinativa (HICKFORD et al., 2011). As PGCs são células precursoras das células germinativas, oogônias e espermatogônia tronco, e têm sido consideradas células importantes para o estabelecimento de bancos genéticos.

PGCs podem ser transplantadas na cavidade celomática de larvas recém eclodidas, permitindo que estas migrem e colonizem a crista gonadal (YOSHIZAKI et al., 2000), ou ainda em receptores na fase de blástula, na região do blastodisco, onde são capazes de migrarem durante o desenvolvimento embrionário para a região da crista gonadal (SAITO et al., 2008). Ao colonizarem esse espaço, estas se desenvolvem em células germinativas tronco com as faculdades genéticas do doador, quando na formação das gônadas (TAKEUCHI et al., 2003 MAJHI et al., 2009). As PGCs são células consideradas pluripotentes, pois são precursoras dos gametas (BRINSTER & ZIMMERMANN, 1994), capazes de transmitir informações genéticas para gerações seguintes (SAITO et al., 2010).

Potencialmente imortais (WAKAHARA, 1990), as PGCs, após migrarem para a região precursora das gônadas e se proliferarem até o início da diferenciação gonadal (FERNÁNDEZ et al., 2015), originam as espermatogônias e oogônias-tronco (PORRAS-GÓMEZ et al., 2021).

1.2. Células germinativas – espermatogônias e oogônias-tronco

Nos teleósteos, as espermatogônias e oogônias-tronco são especialmente atrativas para a exploração biotecnológica de transplante de células germinativas: além dos potenciais de auto renovação e colonização no espaço germinativo do receptor e consequentes proliferação e diferenciação após o transplante, essas células podem originar gametas heterólogos nesse processo (OKUTSU et al., 2006; LACERDA et al., 2012; BOUWMEESTER et al., 2022). O gene *ddx4* é um marcador específico de linhas de células germinativas (HARTUNG et al., 2014). A avaliação da expressão gênica de *ddx4* é uma ferramenta essencial para caracterização das espermatogônias-tronco na etapa de purificação e anterior ao transplante, podendo indicar a integridade deste tipo

celular.

As espermatogônias e oogônias-tronco podem ser transplantadas em larvas via cavidade peritoneal, (YE et al., 2017) ou em adultos estéreis, via papila urogenital (MAJHI et al., 2014). O transplante de células germinativas é uma ferramenta que pode ser aplicada tanto na piscicultura como na conservação de espécies ameaçadas de extinção. Além disso, essa técnica permite a realização de estudos básicos envolvendo a proliferação e diferenciação de células germinativas (MAJHI et al., 2009). Para o transplante de espermatogônias-tronco são necessárias as etapas de purificação destas células, vindas das gônadas de animal doador, e o seu depósito em um receptor da mesma espécie (transplante intraespecífico), ou de uma espécie distinta (transplante interespecífico) (TAKEUCHI et al., 2003; LACERDA et al., 2012). Alternativamente, o transplante em receptores adultos também pode ser realizado por intervenção cirúrgica, onde as células purificadas são transferidas diretamente na gônada do receptor (MAJHI et al., 2009). A técnica cirúrgica também pode ser utilizada para a enxertia de testículo. O auto enxerto testicular subcutâneo realizado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) obteve sucesso na produção autogênica de gametas viáveis. No entanto, a produção de espermatozoides tem sido obtida apenas em linhagens isogênicas ou auto enxertos, enquanto que nos enxertos alogênicos e xenogênicos são rejeitados pelo sistema imunológico dos peixes receptores (HAYASHI et al., 2018; YOSHINAGA et al., 2021).

O transplante de células germinativas também pode ser realizado na cavidade peritoneal de larvas recém eclodidas, onde as células transplantadas migram e colonizam a região da crista gonadal. Oogônias de *Danio rerio* foram introduzidas na cavidade abdominal, sob a bexiga natatória, de larvas híbridas estéreis com duas semanas de idade, sendo obtidos machos capazes de produzirem sêmen dos indivíduos doadores (WONG et al., 2011). Espermatogônias-tronco de truta arco-íris foram transplantadas para a cavidade peritoneal de embriões recém-eclodidos, e machos e fêmeas transplantados produziram espermatozoides e óvulos derivados do doador (OKUTSU et al., 2006). Esses experimentos evidenciaram que as células germinativas possuem um alto nível de plasticidade de desenvolvimento e bipotência sexual, mesmo após o animal atingir a maturidade.

Desde o primeiro ensaio em camundongos (BRINSTER & AVARBOCK, 1994), o transplante de células germinativas tem sido extensamente aplicado em várias espécies e se destaca por contribuir na aquicultura, na medicina reprodutiva para incremento à produção aquícola, e em ações conservacionistas para a reprodução de espécies

ameaçadas de extinção da ictiofauna. Esta tecnologia é potencial para recuperar populações a partir da obtenção de gametas exógenos fecundos e a subsequente geração de suas larvas (MAJHI et al., 2009; NÓBREGA et al., 2009). A geração de quimera germinativa, quando bem estabelecida para uma espécie ameaçada, pode ser empregada em programas de conservação para a espécies ameaçadas de extinção, fazendo com que uma espécie comum possa produzir gametas de espécies raras (COELHO, 2021).

A produção de oócitos exógenos em receptores fêmeas transplantadas é mais complexa que a de espermatozoides nos receptores machos transplantados. O primeiro requer compatibilidade de interação entre as células transplantadas e a granulosa ou teca, o que parece dispensável no transplante em testículos de receptores (PATIÑO & SULLIVAN, 2002; YOSHINAGA, 2018). Somada a barreira hematotesticular, que impede a reação imunológica a tecidos alógenos, tem-se um maior sucesso do transplante de células germinativas masculinas em geral (KAUR et al., 2013). No entanto, foi verificado a presença de macrófagos em testículos de *A. altiparanae* triploides esterilizados com busulfan, transplantados com espermatogônia-tronco de *Brycon orbignyanus* (LÓPEZ, 2022). A presença de macrófagos em gônadas de híbridos receptores de *Pimelodus maculatus* (macho) e *Pseudopimelodus mangurus* (fêmea), transplantados com espermatogônia-tronco de *P. mangurus* também foi verificada (dados não publicados). Estes resultados indicam resposta imunológica nos testículos de receptores transplantados.

1.3. Receptores de células da linhagem germinativa

Previamente ao transplante de células germinativas em adultos, é necessário a geração de receptores completamente estéreis, ou seja, animais que as gônadas sejam livres de células germinativas, permitindo que as células transplantadas possam entrar nas gônadas dos receptores, se proliferarem e colonizarem estas gônadas (BRINSTER et al., 2003; MAJHI et al., 2009). Além disso, é necessário que o receptor tenha compatibilidade fisiológica e imunológica com o doador, crescimento rápido, ciclo reprodutivo curto e fácil manejo em cativeiro (MAJHI et al., 2009). O transplante em receptores estéreis propicia a geração apenas de gametas da espécie doadora, evitando a geração de descendentes híbridos que poderiam ser introduzidos em ecossistemas naturais no caso de escape (PIVA et al., 2016).

Vários métodos de esterilização têm sido usados na geração de indivíduos estéreis,

tais como o cruzamento interespecífico que gera alevinos híbridos (BARTLEY et al., 2001; PIVA et al., 2016), a manipulação cromossômica que origina indivíduos triploides (ADAMOV, 2013), bem como a combinação destas duas metodologias capaz de gerar híbridos triploides efetivamente estéreis (PIVA et al., 2016; Xu et al., 2020). Uso de morfolinos podem induzir a esterilidade dos animais. Estes oligonucleotídeos antisense inibem a tradução de mRNA e quando desenhados para genes específicos de manutenção, diferenciação e migração de PGC são capazes de inibir a migração de PGCs ou mesmo conduzir a apoptose destas células, produzindo indivíduos estéreis (SAITO et al., 2008; HIGAKI et al., 2010). A esterilização química de receptores por fármacos antineoplásicos pode ser empregada para a produção de receptores estéreis, bem como complemento ao método de manipulação cromossômica (LÓPEZ, 2022). Busulfan é a droga mais utilizada para esse fim, pois inibe a proliferação e a diferenciação de células-tronco espermatogoniais e promove a apoptose de uma série de células espermatogênicas (CHEN et al., 2018). Porém, este método pode não esterilizar o animal de forma permanente, uma vez que as células germinativas do receptor, após alguns meses, voltam a se proliferar (ZOHNI et al., 2012; DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015).

Além da necessidade de esterilização dos receptores, o transplante de células germinativas apresenta outro importante revés: a rejeição celular ao procedimento como resposta imunológica (YOSHIZAKI et al., 2012), com consequente perda do transplante (YOSHINAGA, 2018). Quando o transplante é realizado em receptores imunologicamente imaturos, na fase de blástula e larvas recém eclodidas, o transplante de células germinativas indiferenciadas não sofre rejeição celular devido a uma possível tolerância endógena, levando a uma maior taxa de sucesso na produção de gametas (YOSHIZAKI et al., 2012; DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015). No entanto, em receptores adultos, a resposta imunológica às células germinativas após algumas semanas de transplante limita a porcentagem de receptores capazes de gerar gametas oriundos do doador (YOSHINAGA, 2018).

1.4. Resposta imunológica ao transplante

Os efeitos de drogas imunossupressoras em receptores transplantados com células germinativas foram estudados para inibir a reação imunológica. Dentre estes estudos, foi verificado que o uso do imunossupressor ciclosporina A (CsA), um polipeptídeo

cíclico de origem fúngica, prolonga a viabilidade dos enxertos de testículo e de células germinativas na truta arco-íris quando administrada periodicamente, aumentando o sucesso dos transplantes (YOSHINAGA et al., 2018).

As células de defesa dos teleósteos são produzidas em maior escala na porção cranial do rim, um dos principais órgãos linfo-hematopoiéticos desse grupo desprovido de medula óssea e linfonodos (AGIUS & ROBERTS, 2003; DIAS et al., 2004; COSTA et al., 2012). De cor vermelho-vivo, aspecto esponjoso e consistência gelatinosa, o rim dos peixes fica posicionado dorsoventralmente na cavidade celomática, abaixo da coluna vertebral e acima da bexiga natatória (COSTA et al., 2012). O rim cranial, posicionado na porção cranial, foi assumido neste trabalho como o principal órgão de análises histológicas e moleculares de imunossupressão sob os tratamentos com CsA, por produzir as células de defesa imunológica.

As interleucinas são citocinas pró inflamatória produzida por, praticamente, todos os tipos celulares nucleados, principalmente macrófagos, monócitos e células dendríticas, além de serem expressas em linfócitos B, células epiteliais e células NK (*natural killer cell*). Essas proteínas são cruciais na resposta imune aguda contra invasores e lesões, bem como promotoras de estímulo, maturação, proliferação e ativação das células imunológicas (CAMPOS et al., 2008. LEVY-PEREIRA et al., 2021). Algumas interleucinas são antagônicas, responsáveis por silenciar aquelas de ativação. Por isso, as interleucinas são alvos moleculares interessantes para se avaliar com mais acurácia a imunossupressão diante do tratamento de receptores com CsA.

A calcineurina é uma proteína serina/treonina fosfatase dependente de Ca^{2+} e calmodulina, que desfosforila fatores nucleares das células T ativadas (NFAT), facilitando as respostas imunes mediadas por células T. Os inibidores da calcineurina são fundamentais para a imunossupressão após o transplante de órgãos. Ciclofilinas são os receptores intracelulares de imunossupressores, como a CsA. O complexo ciclofilina-CsA interrompe cascatas de transdução de sinal, através da inibição da calcineurina, prevenindo a ativação de células T em mamíferos (LIU et al., 1991, 1992). A CsA tem como receptor intracelular a ciclofilina que formam um complexo, o qual se liga à calcineurina, inibindo a desfosforilação do NFAT, cuja reação é catalisada pela calcineurina. O NFAT fosforilado não migra do citoplasma para o núcleo e, portanto, as transcrições de *interleucina-2* e outras citocinas não são ativadas, impedindo desta forma que ocorra a diferenciação e crescimento dos linfócitos T (Figura 1).

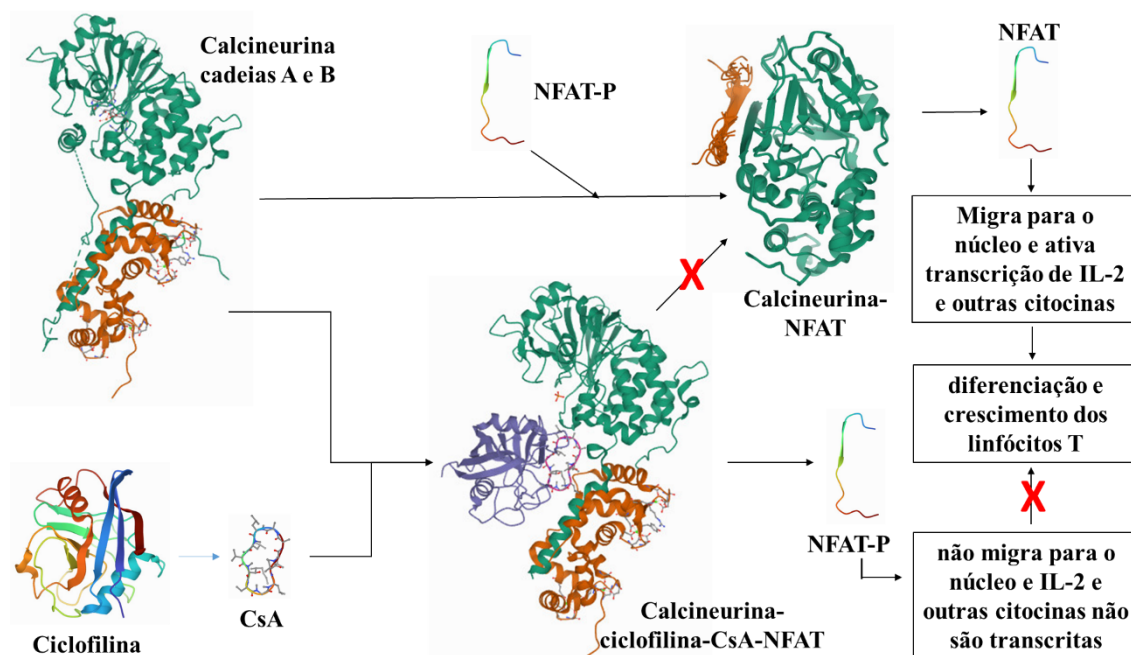


Figura 1: Figura ilustrativa da ativação e inibição da transcrição de *interleucina-2* (*IL-2*) e outras citocinas. Na parte superior da figura é indicada a via de ativação da transcrição de citocinas. Inicialmente, a calcineurina (PDB:4OR9) se liga ao fator nuclear das células T ativadas em sua forma fosforilada (NFAT-P) e catalisa a desfosforilação (NFAT) (PDB:2JOG), permitindo a migração de NFAT para o núcleo e ativando a transcrição de *IL-2* e outras citocinas. Na parte inferior da figura é indicada a via de inibição da transcrição de citocinas. A ciclofilina é ligada a CsA, e este complexo se liga à calcineurina (PDB:1MF8) impedindo a desfosforilação de NFAT-P. Este fator de transcrição fosforilado não migra para o núcleo e a transcrição de citocinas é reprimida.

A CsA é uma droga agressiva, principalmente pelos seus efeitos nefropatológicos tóxicos (YOSHINAGA et al., 2018). Entre os efeitos adversos, são registradas hipertensão e distúrbios eletrolíticos, diminuição de células brancas no sangue, lesões em arteríolas, glomérulos, túbulos e interstício, necrose focal e hialinização (necrose) de miócitos, vacuolização nos citoplasmas dos epitélios tubulares, bem como glomeruloesclerose focal e segmentar (BLANKENSTEIN et al., 2017; NETO et al., 2000). Portanto, é necessário, nesse contexto, estabelecer a concentração ideal do imunossupressor para inibir a diferenciação e crescimento de linfócitos T, visando o equilíbrio entre a inibição da resposta imune sobre as células transplantadas e os menores efeitos adversos possíveis nos receptores.

1.5. Criopreservação de células da linhagem germinativa

Aliado ao transplante, a criopreservação de células da linhagem germinativa se tornou um importante pilar no conjunto de tecnologias que atua diretamente em estudos de conservação das espécies. Nessa técnica, células indiferenciadas armazenadas a baixas temperaturas podem se manter íntegras e viáveis por muitos anos (HAGEDORN et al., 2018), permitindo formar um espectro diversificado de amostras para reconstituir espécies de peixes em extinção no nível global, graças à capacidade regenerativa desse tipo celular (MELO & GODINHO, 2006; LEE et al., 2016; HAGEDORN et al., 2018).

No congelamento, é fundamental que as células germinativas sejam armazenadas sob crioprotetores permeáveis à membrana celular, que apresentam baixa massa molecular (menos de 100 Da) e devem ser utilizados em concentração ideal, para que os mesmos evitem os danos mecânicos celulares ocasionados pelo congelamento, envolvendo a distorção do formato celular causado pelos cristais de gelo e os efeitos químicos e osmóticos de solutos concentrados na água residual descongelada entre os cristais de gelo (WOWK, 2007).

A partir do trabalho de criopreservação de espermatozoides de arenque do Atlântico a -79°C (BLAXTER, 1953), o congelamento de diversos materiais biológicos tem sido cada vez mais explorado e, com os avanços tecnológicos, tem assumido papel essencial na geração de bancos genéticos que visam reverter o declínio de espécies ameaçadas de extinção (HAGEDORN et al., 2018; BOUWMEESTER et al., 2022). Em peixes, embriões (CABRITA et al., 2003; HANG et al., 2020), sêmen (NINHAUS SILVEIRA et al., 2006) e PGCs (KOBAYASHI et al., 2007) são as principais amostras biológicas criopreservadas, assim como as células germinativas espermatogônias e oogônias tronco.

A criopreservação de espermatogônias-tronco em peixes tem sido explorada em diversos estudos, incluindo seu descongelamento e transplante em receptores estéreis (OKUTSU et al., 2006; LACERDA et al., 2010; YOSHIZAKI et al., 2011; LEE et al., 2016). Nos siluriformes, a criopreservação de espermatogônias-tronco é pouco explorada. Em *Pseudopimelodus mangurus* as melhores condições de criopreservação de oogônias-tronco já foram estabelecidas (LÓPEZ, 2018). Em contrapartida, os espermatozoides são o tipo celular frequentemente utilizado na criopreservação desse grupo (RAMIREZ-MERLANO et al., 2010; ŞAHINÖZ et al., 2020).

Os principais crioprotetores utilizados apresentam custos relativamente baixos,

baixa citotoxicidade e possuem propriedades semelhantes, como baixa massa molecular, habilidade de atravessar as membranas das células vivas, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e baixa toxicidade (HANADA & NAGASE, 1980). Dentre eles podemos citar o propanediol, glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilacetamida (DMA), os quais são universalmente utilizados no congelamento de tecidos, linhagens celulares e embriões de muitos organismos (RANA, 1995; WOWK, 2007).

1.6. Visão geral do estudo

Pseudopimelodus mangurus (Valenciennes, 1835), popularmente conhecido como bagre sapo, é uma espécie neotropical que já foi listada como vulnerável no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada do Paraná (IUCN, 2014). Devido a este fato, esse siluriforme vem sendo utilizado em experimentação básica e aplicada de biotecnologias voltadas à sua conservação. Os estudos envolvendo o bagre sapo envolveram o estabelecimento de procedimentos de reprodução e a descrição do desenvolvimento embrionário (ARASHIRO et al., 2018), domesticação e larvicultura (SHIGUEMOTO et al., 2020), marcação de PGCs utilizando metodologias de WISH e microinjeção de mRNA sintetizado *in vitro*, bem como análise de expressão de genes específicos de PGCs durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos de adultos de *P. mangurus* (SHIGUEMOTO et al., 2022). Os trabalhos realizados voltados à conservação de *P. mangurus* incluem o estabelecimento de procedimentos de purificação e criopreservação de oogônias-tronco, bem como o transplante destas células em receptores triploides de mandi (LÓPEZ, 2018).

No presente trabalho, foram estabelecidos os procedimentos de purificação, caracterização molecular e criopreservação de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*. Além disso, foi avaliado o efeito do imunossupressor CsA *in vitro* e *in vivo* sobre *Astyanax altiparanae* triploides, o lambari-do-rabo-amarelo. No estudo *in vitro* foram realizados o isolamento de leucócitos e o cultivo destas células na presença de CsA, sendo verificadas a concentração e a viabilidade dos leucócitos comparadas ao grupo controle sem CsA. No estudo *in vivo*, foram avaliados possíveis efeitos deletérios da administração com CsA em rim cranial e gônada dos animais, bem como a regulação expressão do gene *interleucina-1β* em rins craniais em animais previamente esterilizados com busulfan. Os resultados obtidos contribuirão para a geração do banco

genético de espermatogônias-tronco de *P. mangurus* e a realização do transplante destas células criopreservadas em receptores triploides de *A. altiparanae* esterilizados quimicamente com busulfan. *A. altiparanae* foi escolhida para as análises com CsA pelo fato da esterilização química em triploides já ter sido previamente estabelecida (LÓPEZ, 2022), e por *P. mangurus* e *A. altiparanae* pertencerem a ordens taxonômicas distintas, o que pode resultar em uma maior rejeição das células transplantadas. No entanto, o transplante xenogênico de espermatogônia-tronco do Siluriforme *Rhamdia quelen* (jundiá) no testículo do Cichliforme *Oreochromis niloticus* (tilápia) foi bem-sucedido, sendo observada a produção de espermatozoide do siluriforme no testículo do receptor (SILVA et al., 2016). Esse trabalho indica que o transplante xenogênico de espermatogônia-tronco utilizando peixes de diferentes ordens pode ser realizado com sucesso.

A. altiparanae é uma espécie de Characiformes que, no conjunto de trabalhos publicados, pode ser considerado um modelo emergente para estudos em peixes neotropicais, contemplando procedimentos bem estabelecidos de reprodução, larvicultura e manipulação cromossômica (ADAMOV et al., 2017; BERTOLINI et al., 2018). Esta espécie foi escolhida principalmente pelos procedimentos técnicos já estabelecidos, facilidade de manejo e cultivo em aquários. *A. altiparanae* pode servir também como referência para a esterilização química e imunossupressão seguidas pela reprodução por transplante de células germinativas. Como os procedimentos de triploidização e esterilização química por busulfan já foram definidos sobre *A. altiparanae* (LÓPEZ, 2022), a espécie pode ser utilizada como receptora de espermatogônia-tronco de bagre sapo e para avaliação da posologia e período de administração de CsA. Devido ao curto período para atingir a maturação sexual, cerca de 4 meses, essa espécie permite o aperfeiçoamento de experimentos que envolvam diferentes biotécnicas, que de certa forma, possam conduzir a maior viabilidade dos transplantes e maior sucesso na reprodução de espécies em extinção.

2. Objetivos

2.1. Geral

Estabelecer as melhores condições de criopreservação de espermatogônia-tronco de *Pseudopimelodus mangurus* para geração de banco genético e avaliar ação efeitos do

imunossupressor em receptores juvenis triploides de *Astyanax altiparanae* esterilizados quimicamente.

2.2. Específicos

- i. Estabelecer procedimentos de purificação de espermatogônia-tronco de *Pseudopimelodus mangurus*.
- ii. Avaliar as características de célula tronco das espermatogônias purificadas pela expressão de *ddx4* e atividade da fosfatase alcalina.
- iii. Identificar a melhor condição de criopreservação de espermatogônias-tronco de *Pseudopimelodus mangurus* a partir de soluções crioprotetoras pré-estabelecidas.
- iv. Produzir receptores estéreis de *Astyanax altiparanae* utilizando a combinação das técnicas de manipulação cromossômica e esterilização química.
- v. Avaliar o efeito do imunossupressor CsA sobre o cultivo *in vitro* de leucócitos de *Astyanax altiparanae*.
- vi. Avaliar o efeito de diferentes dosagens do imunossupressor CsA sobre o sistema imunológico de lambaris triploides.
- vii. Avaliar a repressão da expressão gênica de *interleucina-1 β* nos rins craniais de *A. altiparanae* utilizando diferentes dosagens de CsA.

3. Coletas e uso animal em experimentação

Foram utilizados indivíduos machos e fêmeas de *Astyanax altiparanae*, coletados nos tanques de piscicultura do Centro de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio). Os machos de *Pseudopimelodus mangurus*, utilizados para o isolamento de espermatogônias-tronco, foram coletados no Rio Mogiguaçu, em Cachoeira de Emas, Pirassununga-SP (SISBIO # 31836-12), prontamente utilizados nos experimentos. Todos os experimentos foram realizados nas instalações do Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA/ICMBio, em Pirassununga-SP, e conduzidos seguindo as normas do Comitê de Ética para Uso de Animais do CEPTA/ICMBio (CEUA/CEPTA nº0064-1062/2020).

Capítulo 1. Isolamento, caracterização e criopreservação de espermatogônias-tronco de *Pseudopimelodus mangurus*

Resumo

Este capítulo se refere às atividades de isolamento, avaliação de características de células tronco e a criopreservação de espermatogônias-tronco de bagre sapo. A purificação foi realizada através do gradiente de densidade de Percoll de fragmentos de testículo submetidos à dissociação enzimática e pelo plaqueamento diferencial. As frações obtidas foram avaliadas por microscopia, expressão relativa de *ddx4* e atividade da fosfatase alcalina. As células foram criopreservadas utilizando cinco crioprotetores diferentes em três molaridades. As viabilidades celulares de cada etapa foram avaliadas utilizando azul de Trypan e as concentrações determinadas utilizando câmara de Neubauer. Pela análise microscópica, as bandas celulares de 20% e 30% do gradiente de Percoll apresentaram as maiores concentrações de espermatogônia-tronco. Estas bandas celulares foram agrupadas e analisadas em conjunto, sendo obtido cerca de 54% de pureza e 93% de viabilidade, e submetidas ao plaqueamento diferencial. Após cerca de 14 horas de cultivo, foi obtida a pureza em torno de 60%, com 92% de viabilidade. Pela comparação da microscopia de luz branca e de fluorescência foi verificado que as espermatogônias-tronco apresentavam alta atividade da fosfatase alcalina em relação aos espermátocitos e espermátides, em ambas as frações celulares das etapas de purificação. A expressão relativa de *ddx4* foi cerca de duas vezes maior que nas amostras de testículos e do plaqueamento diferencial, sugerindo o enriquecimento de espermatogônias-tronco na etapa de gradiente de densidade de Percoll e diminuição da integridade celular, baseada na expressão deste gene, no plaqueamento diferencial. Por este motivo, células oriundas do gradiente de densidade de Percoll foram utilizadas para a criopreservação. A melhor condição de criopreservação obtida foi com propanediol a 1 M, que apresentou a maior viabilidade das espermatogônias-tronco (98%), em contraste com dimetilacetamida a 2 M que proporcionou cerca de 47% de viabilidade.

4. Materiais e métodos

4.1. Análise da composição histológica do testículo de *P. mangurus*

Dois testículos de machos sexualmente maduros de *Pseudopimelodus mangurus* foram coletados e postos em solução fixadora de Bouin por 24 horas, trocado por álcool 70% diariamente. O testículo foi dividido em três partes: região anterior, média e posterior. As amostras consistiram em estrutura alongada central, contendo o ducto testicular, com um par de franjas filiformes pareadas, localizadas na porção posterior da cavidade corporal, suspensas pelo mesórquio.

O procedimento histológico para inclusão em Paraplast se deu imergindo as amostras em duas soluções seguidas de álcool 80%, 95% e 100%, em cada qual duas vezes durante 15 minutos. Uma solução de álcool absoluto com xilol foi incluída durante 10 minutos, seguida de 5 minutos em soluções de xilol I e xilol II e 3 minutos em xilol III. As amostras foram postas durante 1 hora em solução paraplast:xilol na estufa a 70°C, e em paraplast durante toda a noite. No dia seguinte, foram imersas em paraplast II por 1 hora na estufa a 70°C e incluídas em definitivo em paraplast III, em uma fôrma de gelo. Endurecidas, as amostras foram retiradas da fôrma e as amostras foram cortadas com uma lâmina de aço acoplada a um micrótomo (Leica Biosystems #RM2235, Heidelberg, Germany), na espessura de 5 µm. As amostras foram colocadas sobre lâminas de microscópio.

As lâminas com as amostras de 5 µm em parafina foram submetidas à desparafinação. Para isso, foram imersas em xilol I, II e III durante 5 minutos, respectivamente. Para a reidratação, as lâminas foram imersas em uma série alcoólica decrescente de álcool absoluto, 95%, 80% e 70%. Em seguida, as amostras foram postas em água corrente durante aproximadamente 5 minutos.

Adicionou-se hematoxilina às amostras durante 3 minutos e, imediatamente, o corante foi retirado e as lâminas novamente postas sob água corrente durante aproximadamente 6 minutos (observando-se a reação entre a amostra e a hematoxilina sob efeito da água, para se chegar a um ponto ótimo de coloração e evitar que a mesma seja exagerada). As amostras foram imersas rapidamente em álcool 95%, em corante eosina durante 1 minuto e em água corrente durante o mesmo tempo. Passou-se as amostras em série alcoólica crescente (álcool 70%, 80%, 90% e 100%), e rapidamente em xilol I e II. Mantidas em xilol III, as lâminas já coradas foram montadas pingando-se

bálsamo do Canadá sobre as mesmas e cobrindo-as com lamínula de vidro. Os cortes histológicos foram observados em um microscópio óptico (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e as imagens capturadas com o uso de uma câmera fotográfica (Nikon DSRi2, Nikon, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio.

4.2. Isolamento de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

Dois machos sexualmente maduros de bagre sapo (*Pseudopimelodus mangurus*) foram coletados no rio Mogiguaçu, no distrito de Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP, e mantidos em um tanque com oxigenação contínua e alimentação diária de carne de peixe. Os espécimes foram submetidos à eutanásia por uma solução anestésica de eugenol na concentração de 100 mg/L. Seguidamente, dados biométricos de cada animal foram aferidos: massas total dos peixes e comprimentos total (distância da ponta do focinho até a região terminal da nadadeira caudal) (Figura 2A) e padrão (comprimento da ponta do focinho ao final do pedúnculo caudal). Com um bisturi, abriu-se longitudinalmente a região ventral dos animais, procedendo-se a extrusão das gônadas, separados por cada animal (Figura 2B). Os valores dos dados biométricos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Medidas dos espécimes machos de *P. mangurus* utilizados no isolamento de espermatogônias-tronco.

Indivíduo	Massa total (kg)	Massa gonadal (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento padrão (cm)
1	0,670	1,738	38	32,5
2	0,265	0,925	29	25

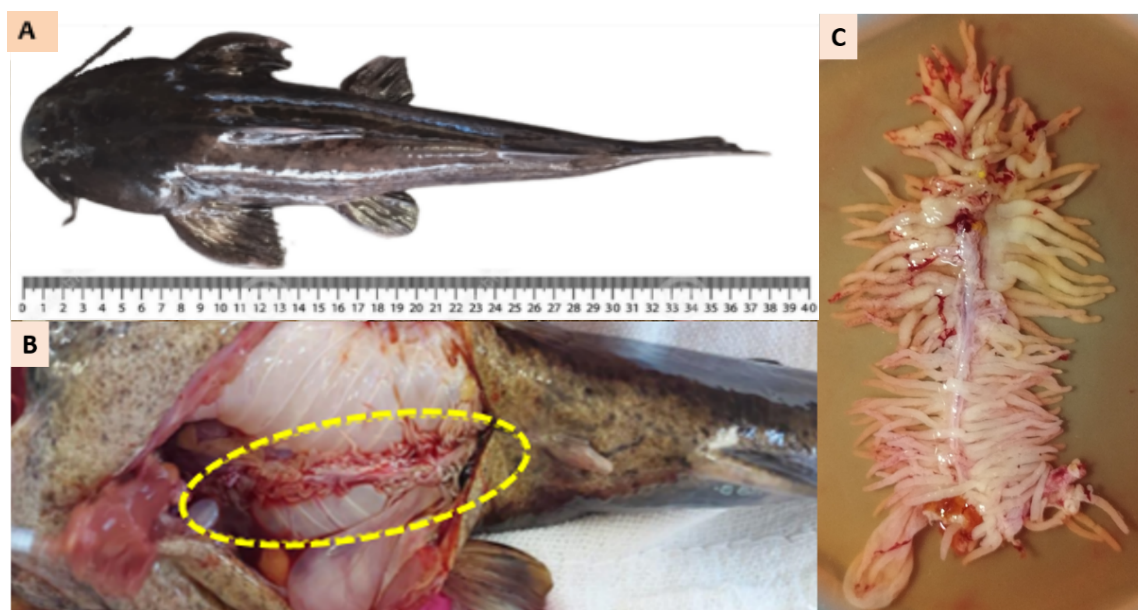


Figura 2. Medida dos comprimentos total e padrão (A); Excisão gonadal (B) (pontilhado) e gônada excisada de macho de *P. mangurus* (C).

Após suas massas serem aferidas, os testículos foram transferidos para placa de Petri estéril de 90 x 15 mm, contendo meio de cultivo celular Leibovitz (gibco #21083027, Grand Island, USA), suplementado com 0,5% soro fetal bovino, 2 mM de glutamina (Sigma #G7513, St. Louis, USA), 1 mM de piruvato (Sigma #S8636, St. Louis, USA), 1X de solução de MEM vitaminas (Sigma #M6895 St. Louis, USA), 1X de solução de MEM aminoácidos não essenciais (Sigma #M7147, St. Louis, USA) e 1X de solução de antibiótico e antimicótico (Sigma #A5955, St. Louis, USA). Em uma cabine de fluxo laminar (FUH12, VECO, Campinas - SP, Brasil), os testículos foram triturados com auxílio de lâminas de bisturi e lavado três vezes com meio Leibovitz (L-15) suplementado, para a eliminação do excesso de células sanguíneas.

O tecido triturado foi transferido para tubos de centrífuga de 15 mL, sendo utilizado cerca de 1,65 g de tecido, e adicionado cerca de 10 mL de meio L15 suplementado. Em seguida, foi adicionado 2 mg/mL de collagenase tipo I de *Clostridium histolyticum* (Sigma #C0130, St. Louis, USA). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente em agitador giroscópico (Agitador PROENIX, São Paulo, Brazil). Após duas horas de incubação, foram adicionados às amostras 20 µg/mL de DNase I (Sigma-Aldrich #SLBT5559, St. Louis, USA) e a reação incubada mais uma hora no agitador. A collagenase é um agente desagregador do tecido conjuntivo tornando as células individualizadas para a etapa de purificação, enquanto que a DNase I degrada o DNA das células rompidas, diminuindo a viscosidade da solução, evitando a agregação das células.

Após os tratamentos enzimáticos, as amostras foram filtradas utilizando novos tubos de centrífuga de 15 mL e filtro de nylon de porosidade de 50 µm de diâmetro, para a retirada do tecido não degradado. O volume da solução celular foi ajustado para 13 mL, utilizando meio L-15 suplementado. Em seguida, o tubo foi centrifugado durante 8 minutos, com força centrífuga de 300 x g, a 25°C (Centrifuge 5702 – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O precipitado celular foi suspenso em 10 mL de meio L-15 suplementado e centrifugado a 300 x g por 5 minutos. Esta etapa de lavagem foi repetida duas vezes para a retirada de collagenase e DNase residuais, bem como a inativação da collagenase. O precipitado celular proveniente da última centrifugação foi

suspensão em 200 μ L de meio L-15 suplementado e submetido ao fracionamento celular em gradiente de densidade de Percoll (Sigma #P1644, Saint Louis, EUA). A purificação das espermatogônias-tronco foi realizada em duas etapas, sendo a primeira através do gradiente de densidade de Percoll e a segunda pelo plaqueamento diferencial. O reagente Percoll é um colóide composto por micropartículas de sílica. Sua versatilidade permite a separação de populações celulares em alta resolução a partir da criação de diferentes gradientes contínuos ou descontínuos de densidades de Percoll. Neste procedimento, as células são fracionadas de acordo com as suas densidades. Dessa forma, as diferentes populações celulares se agrupam em bandas correspondentes às de suas respectivas densidades.

O gradiente de densidade de Percoll foi formado utilizando quatro soluções de diferentes densidades, isto é, com gradientes de densidade nas concentrações de 10%, 20%, 30% e 40% de Percoll. As soluções com Percoll foram preparadas em meio L-15 e o gradiente foi formado adicionando inicialmente a maior concentração (40%) no tubo de centrífuga de 15 mL e seguindo a adição das soluções em ordem decrescente, ou seja 30%, 20% e, por fim, 10%. O volume final do tubo de solução de gradiente final era de 4 mL, formado pelos 4 diferentes gradientes de densidade de Percoll. Os 200 μ L da solução de células, oriundos da última etapa de lavagem, foram depositados sobre a solução de 10% do gradiente de densidade de Percoll e submetido à centrifugação durante 35 minutos, 800 x g, a 25°C (Centrifuge 5702, Eppendorf, Germany). O isolamento das espermatogônias-tronco para o peixe 1 e 2 foram realizadas separadamente. No entanto, para o peixe 2 não foram obtidas bandas visíveis no gradiente de densidade de Percoll e, portanto, não utilizado nas etapas posteriores.

As bandas de 20% e 30% foram recuperadas separadamente, colocadas em tubo de centrífuga de 15 mL, suspensas em 10 mL de meio L-15 suplementado e centrifugada a 300 x g por 8 minutos a 25°C para remoção de Percoll. Em seguida, as células depositadas nos fundos dos tubos de centrífuga foram suspensas em 500 μ L e 200 μ L de meio L-15 suplementado, para as células vindas das bandas de 20% e 30%, respectivamente. As suspensões celulares foram analisadas por microscopia para avaliar a fração contendo o maior percentual de espermatogônias-tronco.

Depois de confirmada a presença de espermatogônia-tronco, 10 μ L de suspensão celular foi utilizada para a quantificação da concentração celular através de uma câmara de Neubauer. Para determinar a viabilidade, 30 μ L de suspensão celular foi adicionada

em 5 μ L da solução de azul de Trypan a 0,4% (Gibco #15250061, Grand Island, USA) e 10 μ L utilizado na câmara de Neubauer para a contagem em microscópio. Estas etapas foram realizadas em triplicata. O azul de Trypan identifica células vivas daquelas mortas, uma vez que as membranas plasmáticas destas últimas já não possuem permeabilidade seletiva e foram danificadas. Desta forma, as células mortas absorvem o corante tornando-se azuis, o que não acontece com as células vivas.

As suspensões celulares oriundas das bandas de 20% e 30% do gradiente de densidade de Percoll foram agrupadas e as células foram submetidas ao plaqueamento diferencial. Para tal, foi utilizado o meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM em alta glicose) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina (Sigma # G7513, St. Louis, EUA), 1 mM de piruvato (Sigma # S8636, St. Louis, EUA) 1X de solução de MEM vitaminas (Sigma # M6895 St. Louis, EUA), 1X de solução de MEM aminoácidos não essenciais (Sigma # M7147, St. Louis, EUA) e 1X de solução antibiótica e antimicótica (Sigma # A5955, St. Louis, EUA). A suspensão celular foi transferida para a placa de cultivo celular (90 mm x 15 mm), adicionado 10 mL de meio de cultivo descrito acima, homogeneizada por movimentos circulares e incubada por cerca de 14 horas em incubadora de CO₂ (Sanyo COM-18AIC (UV) CO₂ Incubator, SANYO Electric Co., Ltd, Japão), em atmosfera com 5% de CO₂ e 100% de umidade, a 30°C de temperatura. O procedimento de isolamento e purificação das espermatogônias-tronco são representadas pela figura 3. Após a incubação no meio de cultivo foi cuidadosamente recuperado e centrifugado a 300 x g por 8 minutos, a 25°C, para recuperação das células não aderidas à placa de cultivo celular, e suspensas em 1 mL de meio L-15 suplementado. As mensurações da concentração de espermatogônias-tronco e a viabilidade celular foram realizadas como descrito para a etapa de purificação por gradiente de densidade de Percoll.

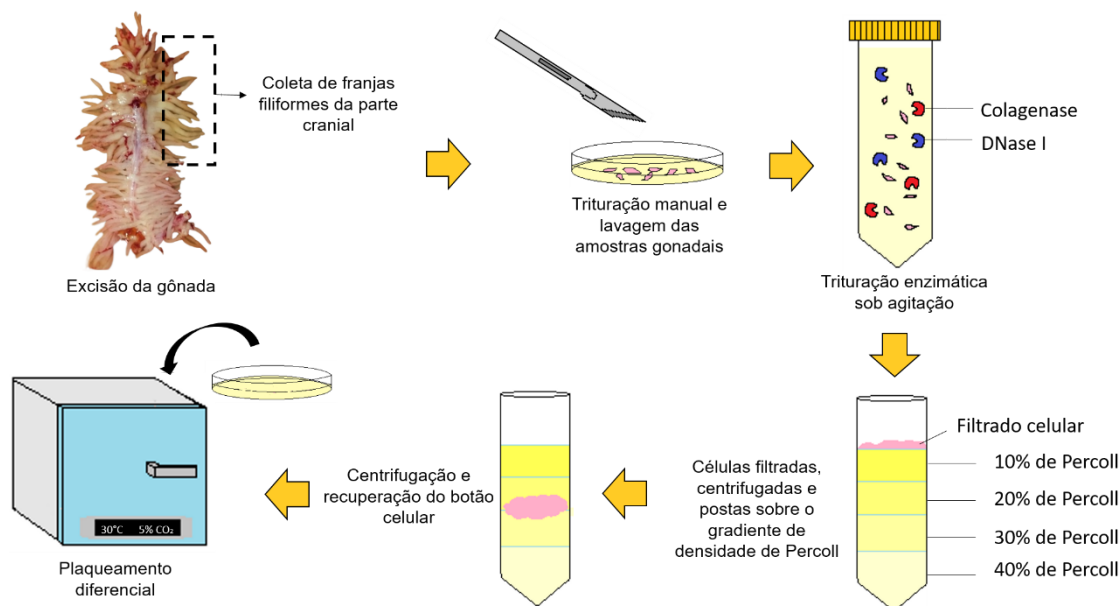


Figura 3. Representação ilustrativa do procedimento de isolamento e purificação de espermatogônias-tronco de *Pseudopimelodus mangurus*.

4.3. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina em espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

A avaliação da atividade da fosfatase alcalina foi realizada utilizando as amostras de espermatogônias-tronco provenientes do isolamento celular por gradiente de densidade de Percoll e do plaqueamento diferencial. Para tanto, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 300 x g para a remoção do meio de isolamento, diluídas em 2 vezes e ressuspensas em 500 µL de solução de Hank's. 1 µL de fosfatase alcalina – AP Live Stain DMSO (Life Technologies, Frederick, EUA) e incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente. As fosfatases alcalinas são enzimas hidrolases responsáveis pela remoção de grupos fosfato de diversas moléculas, e são marcadores de pluripotência das células tronco (KERCHER et al., 2012).

Passado o tempo, as células foram lavadas por centrifugação sob as mesmas condições anteriores, com 500 µL de solução de Hank's. 10 µL de solução celular foram visualizados em câmara de Neubauer através de um microscópio de fluorescência (Nikon, SM18, Tóquio, Japão). Após a visualização, a solução celular foi submetida ao plaqueamento diferencial. 500 µL da solução foi posta em 10 mL de meio de cultivo suplementado com 10% de substituto de soro fetal bovino, em placa de cultivo de 90 mm x 35 mm, e deixado em estufa a 30°C com injeção de 5% de CO₂.

No dia seguinte, as células espermatogoniais-tronco foram novamente contadas quanto à viabilidade, concentração e pureza, bem como novamente submetidas à avaliação da atividade da fosfatase alcalina.

4.4. Avaliação da expressão do gene *ddx4* (*vasa*) em testículo e amostras provenientes das etapas de purificação de espermatogônia-tronco

4.4.1. Extração de RNA de amostras gonadal e espermatogoniais de *P. mangurus*

Para a extração de RNA total do testículo e das amostras oriundas das etapas de purificação de espermatogônias de *P. mangurus*, foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Para tal, foram adicionados 750 µL de Trizol em cada amostra, então maceradas com uso de pistilo e homogeneizadas através de pipetagem. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras contendo material insolúvel foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos (Hermle Labnet # Z326K, Wehingen, Alemanha) e o sobrenadante transferido para novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, 150 µL de clorofórmio foram adicionados a cada solução, seguindo a recomendação de 200 µL/mL de Trizol. As amostras foram novamente incubadas durante 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas durante 15 minutos, a 12.000 x g, a 4°C. A fase aquosa de cada amostra foi transferida para um novo tubo, e a elas, foram adicionados 350 µL de isopropanol, usando a proporção recomendada de 500 µL/mL de Trizol, e a reação foi incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente. As soluções foram centrifugadas por 10 minutos, nas mesmas condições da centrifugação anterior. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em etanol a 75%, sendo a solução mãe preparada com 7,5 mL de etanol a 100% e 2,5 mL de água DEPC livre de RNase. As soluções foram homogeneizadas e novamente centrifugadas durante 5 minutos, a 7.500 x g e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos para evaporação de resíduos de etanol.

O precipitado de RNA total foi suspenso com 15 µL de água DEPC livre de RNase e homogeneizado. As soluções foram expostas a 60°C durante 15 minutos em banho seco. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro microfluídico UV/VIS

QIAxpert (Qiagen, Hilden, Alemanha) e armazenado a -80°C.

4.4.2. Produção de cDNA a partir do RNA de amostras gonadal e espermatozoniais de *P. mangurus*

Para a síntese de cDNA o RNA total purificado foi previamente tratado com DNase I. Para isso, uma reação com total de 10 µL foi preparada contendo 1 µg de RNA purificado, 1 µL de tampão de reação, 1 µL de DNase I (Sigma) e água livre de nucleases para completar o volume de 10 µL. A solução de RNA foi incubada a 25°C durante 15 minutos. Após este período, foi adicionado 1 µL de *stop solution* para inibir a atividade da DNase I e a solução foi incubada a 70°C durante 10 minutos para degradação da enzima.

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™ # 4368814), seguindo as instruções do fabricante. A reação de síntese foi preparada utilizando 2 µL de tampão (10X RT Buffer), 0,8 µL de dNTPs a 100 mM, 2 µL de *random primers* (10X RT Random Primers), 4,2 µL de água DEPC livre de RNase e 1 µL de transcriptase reversa (50 unidades/µL). A essa reação foi adicionado 10 µL da solução de RNA previamente tratada com DNase I. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada em um termociclador (Multigene OptiMax Thermal Cycler – Labnet International), nas condições de 25°C durante 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C infinito.

4.4.3. Avaliação da expressão de *ddx4* por PCR convencional

As avaliações das expressões do gene *ddx4*, bem como do endógeno *rRNA18s*, foram realizadas através de PCR convencional. As reações de PCR foram preparadas utilizando os pares de primers para *ddx4* e *rRNA18s* (Tabela 2) e cDNA de (i) fragmento da parte cranial do testículo, (ii) grão celular oriunda do gradiente de Percoll e (iii) fração celular obtida no plaqueamento diferencial. Os primers utilizados foram desenhados utilizando as sequências dos genes obtidas pelo transcriptoma do ovo de *P. mangurus* depositado no National Center for Biotechnology Information - NCBI (BioProject ID: PRJNA819998).

Tabela 2: Sequências de primers utilizados na avaliação dos genes endógenos e de interesse por PCR convencional e em tempo real.

Primers	Sequência 5'→3'	Amplicon (pb)
<i>ddx4</i> -F	ATCAGAGCCCAGTTGTGTTTT	150
<i>ddx4</i> -R	TCCCAAACTACCGCTACTG	
<i>rRNA18S</i> -F	GTCTGTGATGCCTTAGATGTC	107
<i>rRNA 18S</i> -R	CGAACGGGTTTAAGCGGATT	
<i>β-actina</i> -F	CGTGCTGTCTTCCCATCCA	86
<i>β-actina</i> -R	TCACCAACGTAGCTGTCCTTCTG	

As reações de amplificações foram realizadas utilizando 1 µL de cDNA (cerca de 1200 ng) de cada amostra, 3 µL de tampão (10X tampão de PCR), 0,9 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,6 µL de dNTPs (10 mM cada), 1,5 µL da mistura dos primers (10 µM cada), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 unidades/µL) (Invitrogen™ # 11615036) e 22,7 µL de água DEPC livre de RNase. As reações de PCR com volume final de 30 µL foram submetidas aos seguintes parâmetros de ciclagem: 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos para desnaturação, 57°C durante 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão e um ciclo de 72°C por 10 minutos para extensão final, seguido de 4°C infinito. A reação foi realizada utilizando o termociclador (Multigene OptiMax Thermal Cycler – Labnet International).

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, que foi preparado diluindo 1,4 g de agarose em 70 mL de TBE 0,5X (Tris, ácido bórico e EDTA) e adicionando 3,5 µL do corante SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™ # S33102). O DNA referencial (*ladder*) foi preparado utilizando-se 8 µL de água DEPC livre de RNase, 1 µL de DNA referencial 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ # 10787018) e 1 µL de tampão Blue Juice (Sigma). O preparado do DNA referencial e 25 µL de cada produto de amplificação, contendo 3 µL de tampão Blue Juice, foram depositados nas canaletas do gel. A corrida foi realizada em solução de TBE 0,5X sob uma tensão constante de 70V. Os produtos das amplificações foram visualizados utilizando um transiluminador UV (Accuris E4000 Smartblue, Benchmark Scientific) e fotografados.

4.4.4. Avaliação da expressão relativa de *ddx4*

As análises da quantificação relativa da expressão de *ddx4* foram realizadas utilizando o termociclador em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, Califórnia, Estados Unidos), usando o método da curva padrão para quantificação relativa. A quantificação foi normalizada pelo controle endógeno β -actina e a quantificação relativa foi expressa em relação ao testículo (calibrador). As curvas padrões para β -actina e *ddx4* foram construídas pela diluição seriada de 1:3 utilizando cDNA proveniente da gônada, nas quantias de 648, 216, 72, 24 e 8 ng. As curvas foram construídas juntamente com as análises e em duplicata para cada ponto, sendo utilizado paralelamente o controle negativo de reação (NTC). Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas. Para cada reação foi utilizado 10 μ L de QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 0,1 μ L de ROX dye cyclor (Qiagen, Hilden, Germany), 1 μ L da mistura de primers (250 nM de cada), 400 ng de cDNA, água livre de nucleases para completar 20 μ L de volume final de reação. As condições de amplificação utilizadas foram: Ativação da DNA polimerase a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos (desnaturação das fitas de DNA) e 62°C por 30 segundos (anelamento de primers e amplificação), seguido da curva de Melting de 60°C a 95°C. As análises foram realizadas utilizando o software 7500 Software version 2.0.5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, Califórnia, Estados Unidos). As eficiências (E) das reações de amplificações foram calculadas pelo programa utilizando a equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$.

4.5. Avaliação da melhor condição de criopreservação de espermatogônias-tronco

Após o estabelecimento das condições de purificação e a caracterização de espermatogônia-tronco de *Pseudopimelodus mangurus*, iniciou-se a etapa de criopreservação celular.

4.5.1. Criopreservação de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

Três machos sexualmente maduros de *P. mangurus* foram coletados no mês de

junho e eutanasiados por uma solução anestésica de eugenol na concentração de 100 mg/L. Em trabalhos prévios em nosso laboratório, foi observado que o período de maio a julho é o mais propício para o isolamento das espermatogônias-tronco, devido a intensa taxa de mitose destas células e a baixa concentração de espermatozoide no testículo. Dos animais eutanasiados foram mensuradas as massas corpórea total e gonadal, bem como as medidas dos comprimentos total e padrão. A média de massa total foi de 446,6 g ($\pm 30,86$); a de gônadas, de 1,36 g ($\pm 0,32$). As médias de comprimento total e padrão foram 33,3 cm ($\pm 0,44$) e 28 cm ($\pm 0,57$), respectivamente. Para a criopreservação das espermatogônias-tronco de *P. mangurus* foram realizadas as etapas de dissociação enzimática dos testículos seguida pelo gradiente de densidade de Percoll, como previamente descritos no subtítulo “4.2. Isolamento de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*”. As bandas celulares de 20% e 30% do gradiente de Percoll foram agrupadas e utilizadas na etapa de criopreservação. As células obtidas para cada animal foram suspensas em meio L-15 para ajustar a concentração em $5,3 \times 10^6$ espermatogônias-tronco/mL, sendo cada animal considerado uma réplica experimental. Para a criopreservação das células espermatogoniais foram utilizadas soluções crioprotetoras de acordo com trabalho previamente publicado (LINHARTOVÁ et al., 2014), com modificações. Cinco agentes crioprotetores foram empregados, cada um em três concentrações diferentes (2 M, 3 M e 4 M), sendo eles o etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) e propanediol. Inicialmente foi preparada uma solução estoque contendo D-glicose a 100 mM e soro albumina bovina (BSA) a 1%, preparada em solução de Hanks (0,1855 g/L de CaCl_2 , 0,204 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g/L de KCl, 0,06 g/L de KH_2PO_4 , 0,35 g/L de NaHCO_3 , 8 g/L de NaCl, 0,0475 g/L de NaH_2PO_4 , 1 g/L de glicose, em pH = 7,4).

As quinze soluções crioprotetoras preparadas e utilizadas para a criopreservação apresentavam as seguintes composições: 50 mM de D-glicose, 0,5% de BSA e 2 M, 3 M ou 4 M de cada crioprotetor usado. Para a criopreservação era realizada a mistura de suspensão celular e solução crioprotetora na proporção de 1:1 e, portanto, as concentrações finais dos constituintes das soluções crioprotetoras, bem como a concentração celular, eram diluídas para a metade dos valores iniciais.

As suspensões celulares em condições crioprotetora foram envazadas em palhetas de criopreservação de sêmen de 0,5 mL (IMV Technologies). Para isso, as palhetas eram cortadas para armazenar 70 μL das suspensões celulares. Com o uso de uma

micropipeta, as palhetas eram envazadas e seladas com álcool polivinílico (Sigma # 089K0037, St. Louis, EUA), dispostas em criotubos de 2 mL (Corning Incorporated # 430659, DF, México) e estes transferidos para um recipiente de criopreservação, Corning CoolCell (Biocision, CoolCell®LX). O recipiente era então colocado em freezer a -80°C por duas horas. Em seguida, os criotubos eram armazenados em nitrogênio líquido e mantidos nesta condição por aproximadamente uma semana. Para cada macho, eram utilizados cinco criotubos, com três palhetas cada, sendo cada palheta uma concentração específica do mesmo agente crioprotetor.

4.5.2. Descongelamento das espermatogônias e aferimento da viabilidade celular

Cada criotubo contendo as palhetas foi individualmente retirado do nitrogênio e imediatamente imerso em um recipiente com água destilada a 30°C, permanecendo nesta condição durante um minuto, para o descongelamento das amostras. Em seguida, as três palhetas de cada criotubo foram retiradas do mesmo, secas e suas extremidades cortadas para desobstruí-las. O conteúdo foi separadamente transferido para microtubos de centrífuga de 1,5 mL e centrifugado durante 5 minutos a 350 x g (Hermle Labnet # Z326K, Wehingen, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 30 µL de solução de Hanks contendo 5 µL solução de azul de Trypan a 0,4%. Três contagens foram realizadas na câmara de Neubauer para cada concentração do crioprotetor.

4.5.3. Análises estatísticas

Os dados de viabilidade das espermatogônias-tronco para os diferentes crioprotetores foram analisados estatisticamente utilizando os programas Statistica, BioEstat e PAST 4.03 pelos testes de ANOVA e Kruskal-Wallis.

5. Resultados

5.1. Análise histológica do testículo de *P. mangurus*

Através da análise microscópica dos cortes histológicos das regiões cranial (Figuras 4A e 4B), média (Figuras 4C e 4D) e caudal (Figuras 4E, 4F e 4G) dos testículos de *P.*

mangurus foi verificado que as células espermatogoniais-tronco, distintas visualmente das suas formas diferenciadas pelo seu maior tamanho, núcleo grande predominantemente na região central da célula e coloração mais acidófila, são mais abundantes na região cranial do testículo em relação à parte média da gônada. Na porção média dos testículos, apesar de ainda presentes, as espermatogônias-tronco se mostravam em menor número e contrastavam com maiores quantidades das suas versões mais diferenciadas, tais como as espermátides fortemente basófilas.

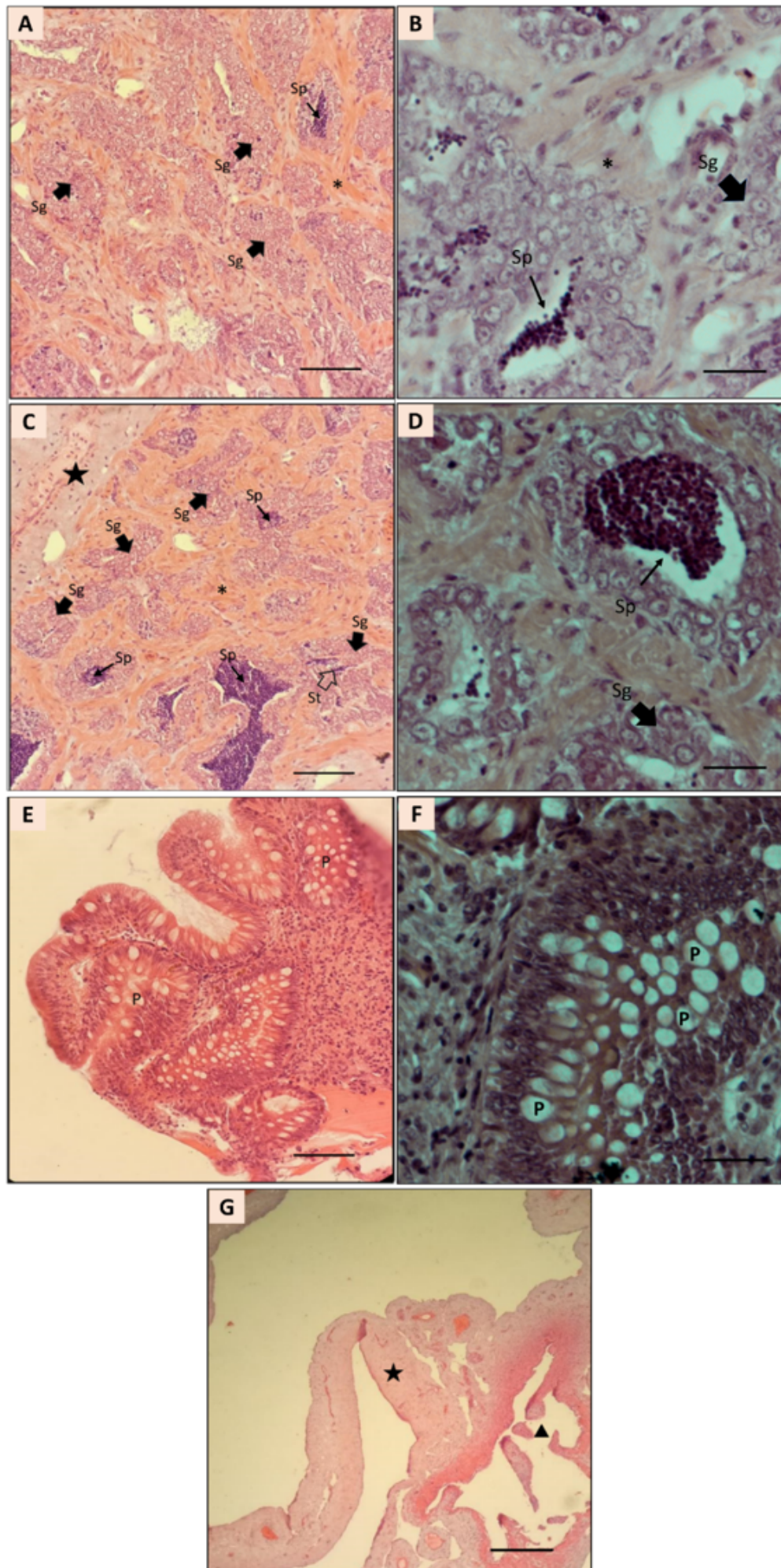


Figura 4. Histologia dos testículos de *P. mangurus*. **A e B:** Cortes histológicos da parte cranial do testículo que contém as franjas filiformes, sendo observado ninhos predominantes de espermatogônias (Sg), seguido de espermatócitos (Sp). **C e D:** Corte histológico da parte média do testículo, sendo **C e D** franjas filiformes com transição entre ninhos com espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sp) e espermátides (St); estrela: tecido conjuntivo; asterisco: tecido intersticial. **E e F:** porção secretora da parte final do testículo, com projeções digitiformes secretoras (P). **G:** parte estruturada por tecido conjuntivo (asterisco), contendo o lúmen do ducto seminífero (triângulo) na região cranial do testículo **A, C, E e G:** escala de 50 μ m. **B, D e H:** escala de 200 μ m.

Através das análises das porções dos testículos pode ser verificada uma transição espermatogênica. A parte cranial (Figuras 4A e 4B) abriga o início do processo da espermatogênese, sendo desprovida de espermatozoides e abrigando células germinativas indiferenciadas, sobretudo espermatogônias em ninhos, formando um sistema altamente ramificado. Na parte média (Figuras 4C e 4D), as espermatogônias começam a se diferenciar em espermatócitos e espermátides, de menor tamanho. Na porção final dos testículos (Figuras 4E e 4F) foram encontrados principalmente espermatozoides. As células germinativas mais indiferenciadas, como as espermatogônias, se agrupam em ninhos em regiões vascularizadas, separadas por tecido intersticial. A parte média compõe o ducto seminífero. A espermatogênese se transcorre ao longo das paredes dos tubos seminíferos (Figura 4G), os quais se anastomosam e liberam os espermatozóides no lúmen do ducto seminífero.

A parte final é exclusivamente secretora, com pouquíssimas células germinativas indiferenciadas ocupando os compartimentos germinativos nas franjas (Figura 3E), representadas por alguns espermatozoides a serem secretados no lúmen do ducto espermático.

5.2. Isolamento de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

No gradiente de densidade de Percoll (Figura 4) foi observada a formação de bandas celulares no gradiente de 10% de Percoll, constituída predominantemente por “debris” celulares oriundos do processo de dissociação enzimática, e outras duas bandas em 20% e 30% de Percoll, as quais continham as maiores concentrações de espermatogônias-troncos e que foram utilizadas para etapa do plaqueamento diferencial. A banda de 20% do gradiente de densidade de Percoll é a que continha o maior número de espermatogônias-tronco. As fases celulares mais diferenciadas, como espermatócitos, espermátides e espermatozóides foram observados com mais frequência

na banda de 30% do gradiente de densidade de Percoll. Eritrócitos foram encontrados no pellet no fundo do tubo de centrifuga.

As concentrações de espermatogônias-tronco obtidas nas bandas do gradiente de densidade de Percoll de 20% e 30% foram de $2,4 \times 10^6$ espermatogônias/mL e $1,44 \times 10^5$ espermatogônias/mL, respectivamente. A suspensão celular da banda de 20% do gradiente de Percoll foi suspensa em 500 μ L e a de 30% em 200 μ L de meio L-15 suplementado; portanto, a quantidade de espermatogônia recuperada para a banda de 20% foi de $1,2 \times 10^6$ espermatogônias e $0,288 \times 10^5$ para a banda de 30%. Utilizando o gradiente de densidade de Percoll foi obtido um rendimento de aproximado de $1,23 \times 10^6$ espermatogônias-tronco provenientes de 1,74 g de testículo inicialmente utilizado.

As imagens dos tipos celulares encontrados nas bandas do gradiente de densidade de Percoll são mostradas na Figura 5. Os grupos celulares de espermatogônias são distintos pelo seu maior tamanho em relação às suas formas mais diferenciadas, como espermatócitos, espermatídes e espermatozóides.

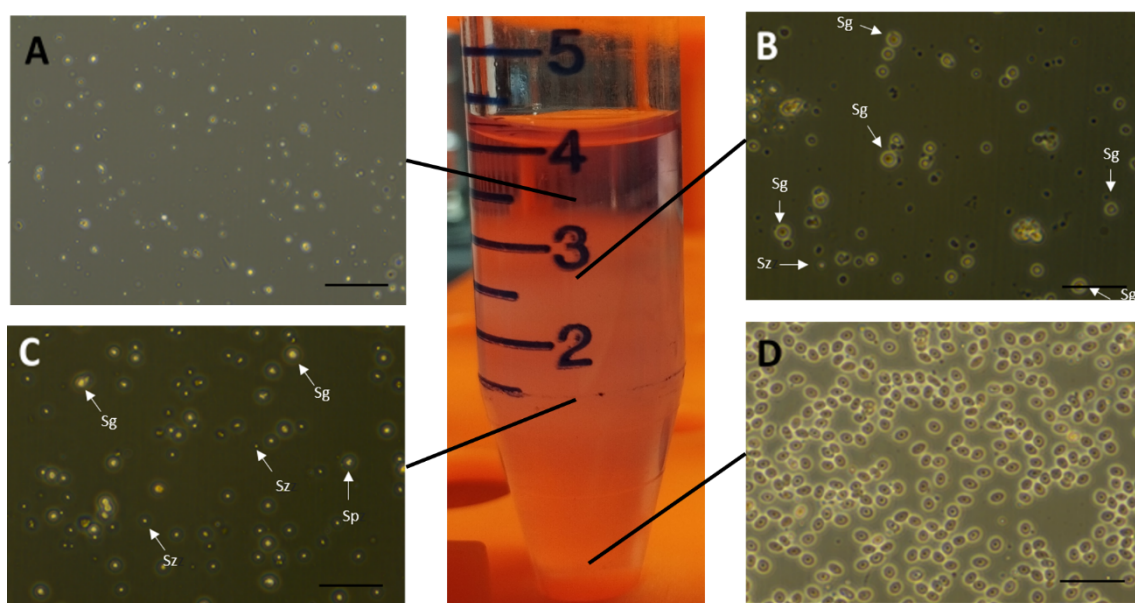


Figura 5. Fracionamento das células testiculares de *Pseudopimelodus mangurus* por gradiente de densidade de Percoll. **A:** banda de 10% de Percoll apresentando “debris” celulares e possíveis células somáticas. **B:** banda de 20% de Percoll. **C:** banda de 30% de Percoll. Nas bandas de 20% e 30% de Percoll foram obtidas as maiores concentrações de espermatogônias (Sg) em relação a espermatócitos (Sp) e espermatozóides (Sz). **D:** pellet predominando hemácias. Escala de 50 μ m.

Antes do plaqueamento diferencial, as bandas de 20% e 30%, que foram agrupadas, apresentavam $54,82\% \pm 2,84$ de pureza de espermatogônias-tronco, e também $33,19\% \pm$

1,46 de espermatócitos/espermátides e $11,96\% \pm 3,81$ de espermatozoides. Após o plaqueamento diferencial, a pureza de espermatogônias aumentou para $60,14\% \pm 2,93$, diminuindo as porcentagens de espermatócitos/espermátides para $30,14\% \pm 4,64\%$, e o de espermatozóides, para $9,10\% \pm 3,24$.

Após o plaqueamento diferencial, as células recuperadas foram analisadas por microscopia quanto a sua composição celular (Figura 6), sendo obtida uma concentração de $9,15 \times 10^5$ espermatogônias-tronco/mL, em um total de 1 mL de suspensão celular. Com isso, um total de $9,15 \times 10^5$ espermatogônias-tronco foi recuperado na etapa do plaqueamento diferencial vindo de aproximados 1,74 g de testículo. Apesar de aparentar uma maior purificação de espermatogônias-tronco no plaqueamento diferencial em relação ao gradiente de densidade de Percoll (Tabela 3), a adição deste passo de purificação conduziu a uma redução de cerca de 26% de espermatogônias-tronco em comparação com aquelas obtidas no gradiente de densidade de Percoll.

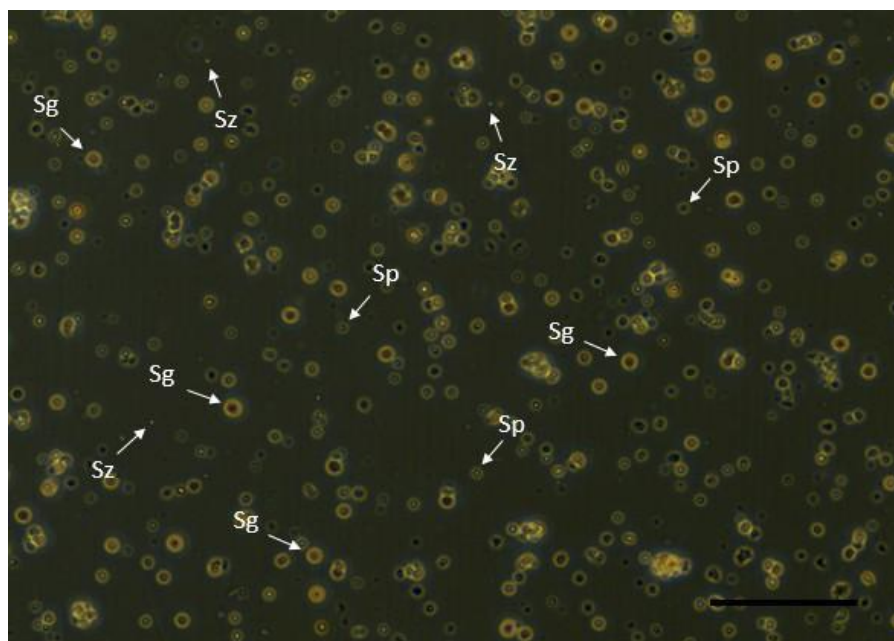


Figura 6. Imagens dos tipos celulares encontrados após a etapa de purificação pelo plaqueamento diferencial. Sg: espermatogônia; Sp: espermatócito; Sz: espermatozoide. Escala: 50 μ m.

A viabilidade e pureza de espermatogônias-tronco oriundas das etapas de purificação estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da viabilidade e pureza de espermatogônias-tronco nas etapas de purificação.

Etapas de Purificação	Viabilidade (%)	Pureza (%)
Gradiente de Percoll	93,33 $\pm$ 2,08	54,82 $\pm$ 2,84
Plaqueamento	92,00 $\pm$ 4,58	60,13 $\pm$ 2,93
<i>p-value</i>	0,7995	0,0874

5.3. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina em espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

As análises da atividade da fosfatase alcalina nas células oriundas das etapas de purificação evidenciaram que as espermatogônias-tronco apresentam maior atividade desta enzima quando comparado com outros tipos celulares, como espermatócitos e espermatídes, presentes nas frações celulares obtidas no gradiente de densidade de Percoll e do plaqueamento diferencial (Figura 7A). As espermatogônias apresentaram maior intensidade de fluorescência tanto na etapa do gradiente de densidade de Percoll, quanto no plaqueamento diferencial (Figuas 7A e 7B), que os outros tipos celulares.

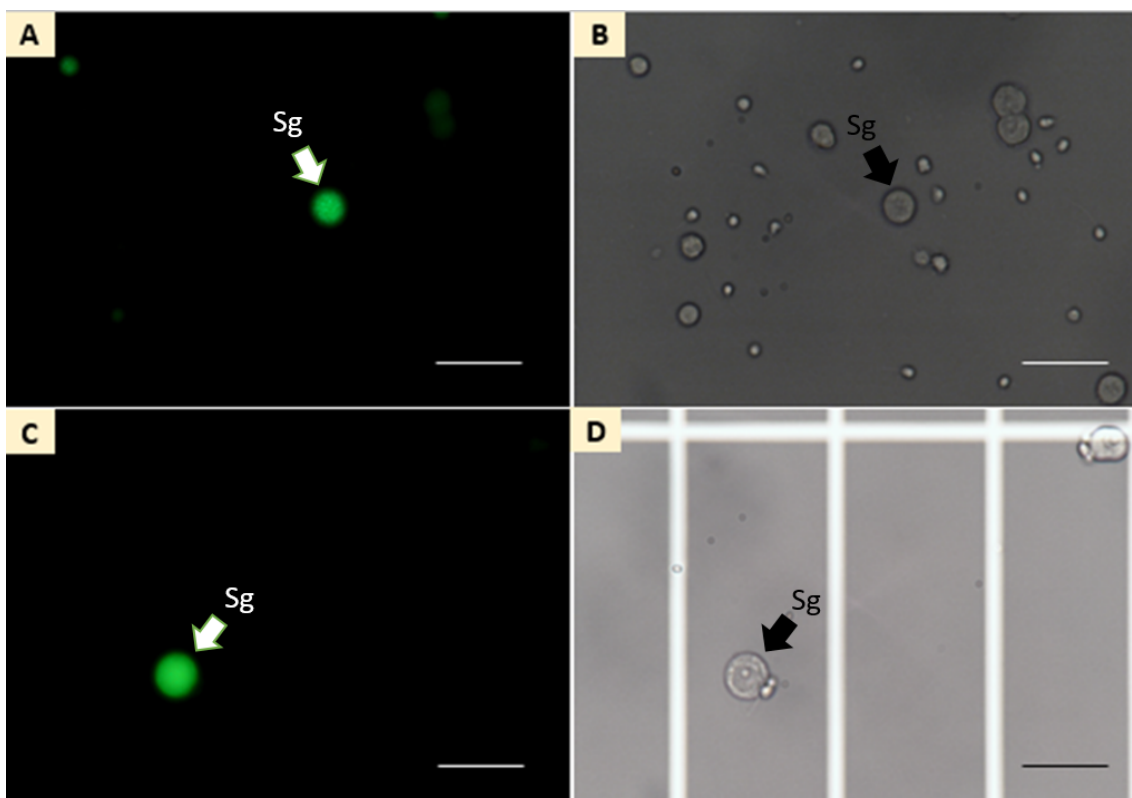


Figura 7. Imagem de microscopia de fluorescência e luz branca de espermatogônias-tronco de *P. mangurus* na etapa de avaliação da atividade da fosfatase

alcalina. Sg: espermatogônia-tronco. **A:** espermatogônias-tronco oriundas do gradiente de densidade de Percoll fortemente fluorescentes. **B:** mesma imagem de **A** sob luz branca. **C:** espermatogônias-tronco oriundas do plaqueamento diferencial apresentando intensa fluorescência. **D:** mesma imagem de **C** sob luz branca. Escala: 100 μ m.

5.4. Avaliação da expressão de *ddx4* por PCR convencional nas amostras espermatogoniais de *P. mangurus*

A expressão do gene *ddx4* foi detectada nas amostras de testículo e da fração celular obtida no gradiente de densidade de Percoll, enquanto que na fração celular oriunda do plaqueamento diferencial não foi observado banda bem definida para o produto de amplificação (Figura 8). A expressão do gene endógeno *rRNA 18S* foi observada em todas as amostras, apesar de uma banda de baixa intensidade para células oriundas do plaqueamento diferencial. Isto indica que células espermatogoniais de *P. mangurus* submetidas ao plaqueamento diferencial, nas condições utilizadas no presente trabalho, comprometem a expressão de *ddx4*. Na análise de eletroforese em gel de agarose (Figura 8) foi verificado apenas um produto de amplificação para *ddx4* e *rRNA 18S*, indicando a especificidade dos primers utilizados.

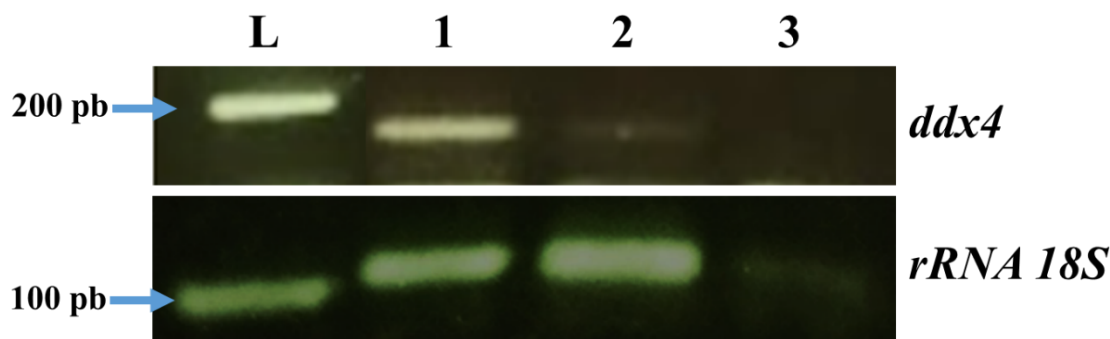


Figura 8. Gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de *ddx4* e *rRNA 18S* das amostras de testículo (1), células oriundas do gradiente de densidade de Percoll (2) e do plaqueamento diferencial (3). L: ladder 1 kb plus.

5.5. Avaliação da expressão relativa de *ddx4* por PCR em tempo real em amostras de purificação de espermatogônias de *P. mangurus*

As curvas padrões construídas para *ddx4* e β -actina apresentaram eficiências das amplificações dentro do permitido (entre 90% e 110%), sendo a eficiência de 98% para *ddx4* e 91% para a β -actina. Os pontos amostrais foram observados dentro dos limites das curvas, com exceção da amostra oriunda do plaqueamento diferencial. A curva

padrão obtida para β -actina está mostrada na Figura 9A e 9B e para $ddx4$ na Figura 10A e 10B.

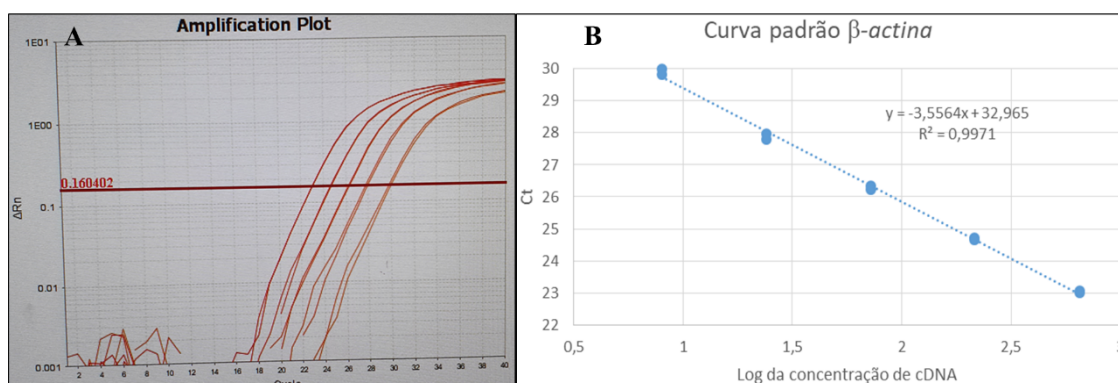


Figura 9. Curva da curva padrão da β -actina. **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.

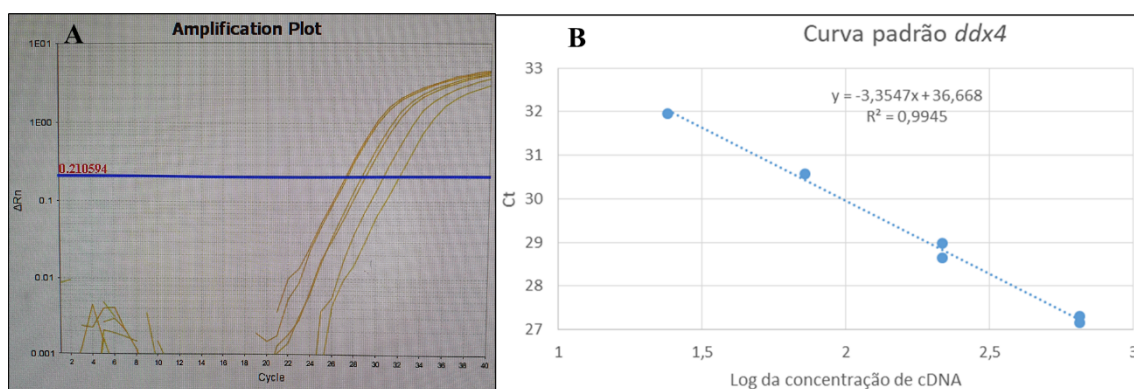


Figura 10. Curva da curva padrão de $ddx4$. **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.

As curvas de Melt para β -actina e $ddx4$ estão mostradas nas Figuras 11A e 11B, respectivamente. Para o $ddx4$, o ponto de menor concentração de cDNA (8 ng) foi retirado devido à presença de dímeros observada na curva de Melt (não mostrado), obtendo-se um melhor ajuste na regressão linear. Além disso, foi observado que a amostra proveniente do plaqueamento diferencial, apresentava Ct acima do estabelecido na curva e a presença de um segundo pico em 74°C, sugerindo a formação de dímeros de primers. Apesar disso, ainda consideramos a expressão relativa obtida para o plaqueamento diferencial, no intuito de comparação com as outras amostras, mesmo sabendo que a expressão relativa obtida não é exata, devido à presença dos dímeros.

Os dados obtidos da expressão relativa sugerem que $ddx4$ é cerca de duas vezes

mais expresso nas células provenientes do gradiente de densidade de Percoll do que na amostra de testículo. Após o plaqueamento diferencial, as células apresentaram um decaimento na expressão de *ddx4*, chegando a níveis próximos ou inferiores aos do testículo (Figura 12).

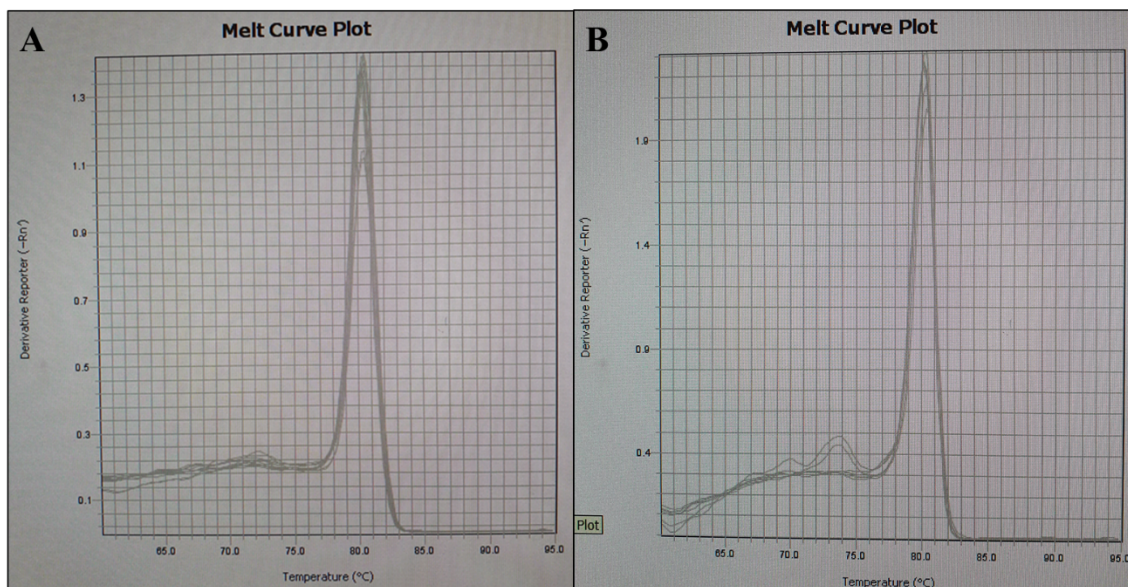


Figura 11. Gráfico da curva de Melt para os pontos das curvas padrões para β -actina (A) e *ddx4* (B). No último ponto da curva de Melt, correspondente a 24 ng de cDNA e Ct 32 na curva de amplificação, pode ser notado um pico de pequena amplitude na temperatura de 74°C, indicando uma pequena formação de dímero (B).

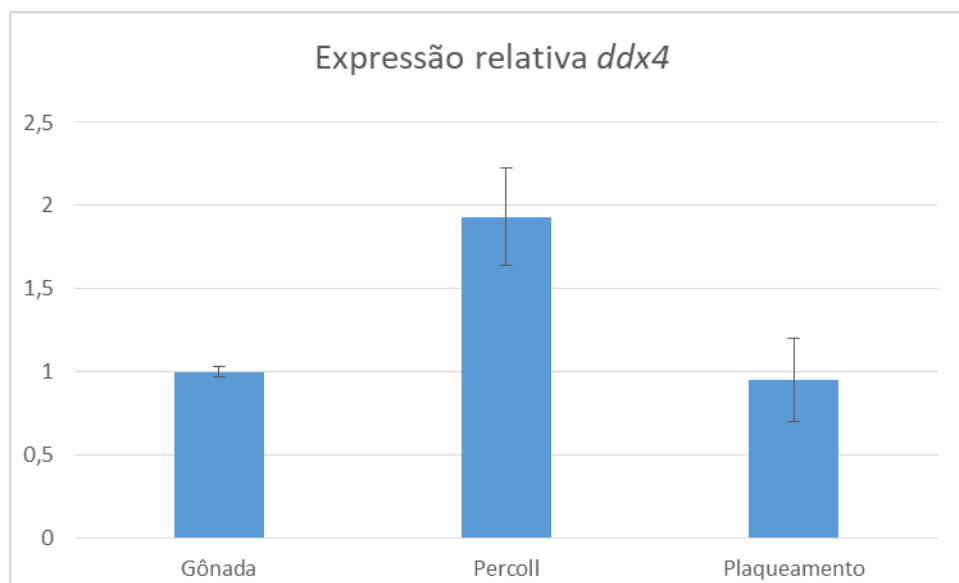


Figura 12. Expressão relativa de *ddx4* nas amostras de testículo, gradiente de densidade de Percoll e plaqueamento diferencial. A expressão relativa referente ao plaqueamento diferencial pode estar superestimada devido à formação de dímeros de primers na

reação de amplificação.

5.6. Criopreservação de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

Foi observado que os tratamentos de criopreservação sob diferentes crioprotetores e molaridade apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. As contagens em triplicata de alguns tratamentos apresentaram um desvio padrão muito alto. O crioprotetor propanediol a 1 M proporcionou a maior viabilidade celular comparado aos outros tratamentos, seguido do mesmo crioprotetor a 1,5 M e etilenoglicol a 2 M, comparados ao grupo controle. As viabilidades celulares são representadas pela Tabela 4.

Tabela 4. Viabilidade de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*, oriundas da etapa de purificação do gradiente de densidade de Percoll, para os cinco crioprotetores em três concentrações molares.

Crioprotetor	Molaridade (M)	Viabilidade (%)		
Controle pré congelamento		92,6	±	4,5 ^a
	1	98	±	2,5 ^a
Propanediol	1,5	94,5	±	5,5 ^a
	2	79	±	24,6 ^a
	1	69,25	±	31,2 ^b
DMA	1,5	69,25	±	23,3 ^b
	2	47,25	±	27,5 ^b
	1	67	±	41,8 ^{ab}
DMSO	1,5	76,75	±	38,7 ^{ab}
	2	76	±	15,3 ^{ab}
	1	79,25	±	31,6 ^{ab}
Glicerol	1,5	77,5	±	33,6 ^{ab}
	2	77	±	35,1 ^{ab}
	1	69,25	±	24,5 ^{ab}
Etilenoglicol	1,5	81	±	2,6 ^{ab}
	2	85,75	±	28 ^{ab}
Controle pós congelamento		1,6	±	2,3 ^c
p-value:		0,0174		

As etapas de purificação e criopreservação de espermatogônias-tronco de *P. mangurus* foram realizadas com sucesso, sendo obtido grau de pureza compatível ao de outras espécies no gradiente de densidade de Percoll.

6. Discussão

6.1. Análise histológica do testículo de *P. mangurus*

Através da análise histológica, foi possível evidenciar a composição celular testicular dos espécimes machos de *P. mangurus*, em que as células indiferenciadas de interesse no projeto, especificamente espermatogônias-tronco, se abrigam nos compartimentos germinativos da região cranial.

Melo (2010) relacionou a estrutura gonadal de algumas espécies de siluriformes com suas estratégias reprodutivas, ligadas ao hábito migratório. *Pseudopimelodus mangurus* é uma espécie migradora reofílica de longa distância (SANTOS, 2013; ARASHIRO et al., 2018) e com fertilização externa (OLIVEIRA et al., 2013). A natureza macroscópica dos testículos de *P. mangurus* se assemelha à de *Conorhynchos conirostris* (Pimelodidae, siluriformes), também migrador reofílico (MELO, 2010), em relação à presença de pequenas franjas filiformes nos testículos (MELO, 2010).

Na região central próxima ao ducto seminífero, são visíveis projeções digitiformes com células prismáticas tipicamente secretoras de glicoproteínas neutras, alinhadas à descrição de Guimarães-Cru et al. (2005).

6.2. Isolamento de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

O enriquecimento e a purificação de células germinativas são necessários para diminuir a heterogeneidade celular e aumentar as quantidades de espermatogônias ou oogônias-tronco para o uso na criopreservação e transplante. Portanto, as técnicas de isolamento celular são empregadas para separar populações de células com diferentes propriedades físico-químicas e bioquímicas, tamanho, densidade, características eletrostáticas, bem como de expressão diferencial de marcadores específicos da superfície celular (DIOGO et al., 2014). Diferentes métodos de purificação de células germinativas foram estabelecidos para isolamento de populações homogêneas, tais como a usando elutriação centrífuga (processo de separação de partículas minúsculas

por decantação potencializada pela centrífuga), gradiente de densidade, plaqueamento diferencial, pelo método de citometria de fluxo - FACS (*fluorescence-activated cell sorting*), pelo uso de esferas magnéticas ligadas a anticorpos - MACS (*magnetic-activated cell sorting*) e combinações desses métodos, os quais foram revisados por XIE et al. (2020).

Neste trabalho foi utilizado o enriquecimento e purificação pela combinação dos métodos de gradiente de densidade de Percoll e plaqueamento diferencial. Em trabalho similar, o grau de pureza de espermatogônias-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) obtidos nas etapas de purificação, foi de cerca de 58% no gradiente de densidade de Percoll e de 66% no plaqueamento diferencial (LÓPEZ, 2022). Estas porcentagens de pureza são similares aos obtidos para purificação do bagre sapo, de aproximadamente 55% para o gradiente de Percoll e de 60% para o plaqueamento diferencial. Em ambos trabalhos, o plaqueamento diferencial aumentou o grau de pureza de espermatogônias-tronco, sendo obtido um aumento de cerca de 8% de pureza de espermatogônia-tronco de piracanjuba e de 6% para o bagre sapo. Portanto, as etapas de purificação empregadas neste trabalho foram eficientes para o enriquecimento de espermatogônias-tronco, possibilitando a utilização destes fracionamentos celulares na geração de bancos genéticos e no transplante em gônadas de receptores estéreis.

A purificação de espermatogônia-tronco do Siluriforme *Rhamdia quelen* foi realizada utilizando dois passos de Percoll, sendo uma primeira etapa realizada em Percoll a 40%, para separação de eritrócitos e espermatozoides, e uma segunda etapa em Percoll a 35%. Após este procedimento as células foram submetidas ao plaqueamento diferencial, para eliminação de células somáticas (SILVA et al., 2016). No entanto, estes autores não forneceram os dados de pureza dos passos de purificação.

LÓPEZ (2018) realizou a purificação de oogônia-tronco de *P. mangurus*, obtendo uma viabilidade celular média de 87% para as frações celulares oriundas do gradiente de 20% e 30% de Percoll, similar aos 93% obtido neste trabalho. Porém os dados de pureza da oogônia-tronco oriunda do gradiente de densidade de Percoll não foram fornecidos pela autora.

6.3. Caracterização das espermatogônias-tronco de *P. mangurus*

As espermatogônias-tronco purificadas no gradiente de percoll e plaqueamento diferencial apresentaram maior atividade de fosfatase alcalina em relação aos outros

tipos celulares presentes nas etapas de purificação, como espermatídes, espermatócitos e espermatozoides. Este fato indica que as células enriquecidas em maior concentração são realmente espermatogônias-tronco. A maior atividade da fosfatase alcalina em espermatogônia-tronco que espermatócito também foi observada nas etapas de purificação de espermatogônia-tronco de *Brycon orbignyanus* (LÓPEZ, 2022) e oôgonia-tronco de *Brycon amazonicus* (CARVALHO, 2021).

Os resultados da expressão gênica relativa do gene *ddx4* indicaram que a expressão deste gene é cerca de duas vezes maior em células vindas do gradiente de densidade de Percoll em relação ao testículo e das células oriunda do plaqueamento diferencial. O aumento da expressão de *ddx4* no gradiente de densidade de Percoll se dá graças ao enriquecimento de espermatogônia-tronco nessa fração celular em relação ao testículo. Em *Rhamdia quelen* e *Colossoma macropomum*, *ddx4* é expresso principalmente em espermatogônia do tipo A e B, com uma leve expressão em espermatídes e não sendo detectada a expressão em espermatozoides (RICCI et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2019). Porém, mesmo com o aumento da pureza de espermatogônia-tronco no plaqueamento diferencial, foi observado uma diminuição da expressão relativa de *ddx4* destas células em relação à etapa do gradiente de densidade de Percoll. Este fato deve ter ocorrido devido ao cultivo celular que indica uma alteração na expressão deste gene, o qual pode alterar características importantes destas células a serem transplantadas. A diminuição da expressão de *ddx4* nas células plaqueadas pode estar relacionada à dependência de interações com outros tipos celulares, como as células de Sertoli. Resultados similares foram encontrados nas etapas de purificação de espermatogônia-tronco de *Brycon orbignyanus* (LÓPEZ, 2022) e oôgonia-tronco de *Brycon amazonicus* (CARVALHO, 2021).

6.4. Criopreservação de espermatogônias tronco de *P. mangurus*

A criopreservação de oôgonia-tronco de *P. mangurus* foi realizada por LÓPEZ (2018), utilizando os mesmos crioprotetores empregados neste trabalho. Oogônias e espermatogônias-tronco de *P. mangurus* apresentaram maior viabilidade após o congelamento utilizando o mesmo crioprotetor, o propanediol, sendo obtido cerca de 80% de viabilidade das oogônias-tronco como propanediol a 1,5 M e 98% para espermatogônia-tronco com o propanediol a 1 M. A segunda melhor condição de criopreservação de espermatogônia-tronco de *P. mangurus*, propanediol a 1,5 M,

apresentou viabilidade de 94%, sendo maior que a viabilidade de oogônia-tronco de *P. mangurus* (80%), observada nesta mesma condição de criopreservação. A comparação destes resultados indica que o crioprotetor propanediol apresentou as melhores condições para a criopreservação de células germinativas de *P. mangurus*, com viabilidade celular acima de 80%.

Resultados similares de ação crioprotetora do propanediol em espermatogônias-tronco são observados nos experimentos de criopreservação de espermatogônia-tronco de *Brycon orbignyanus* (LÓPEZ, 2022) e de *P. mangurus*. LÓPEZ (2022) verificou que a melhor condição de criopreservação de espermatogônia-tronco foi o propanediol a 1 M, com viabilidade após o descongelamento de cerca de 91%, sendo aproximadamente similar ao obtido para espermatogônia-tronco de *P. mangurus* (98%). Além disso, o propanediol a 1,5 M foi a segunda melhor condição de criopreservação em ambos estudos, sendo a viabilidade em torno de 68% para espermatogônia-tronco de *Brycon orbignyanus* e de 94% para *P. mangurus*.

O propanediol também foi o melhor crioprotetor para oogônia-tronco de *Brycon orbignyanus* (CARVALHO, 2021), sendo obtida a maior viabilidade (78%) em propanediol a 2 M, seguido do propanediol a 1 M, com viabilidade de 76%. A comparação destes resultados sugere que o propanediol tem se mostrado o melhor crioprotetor avaliado nas espécies de peixes da região Neotropical, tanto para oogônias como para espermatogônias. Além disso, a viabilidade das espermatogônias é maior que as de oogônias, nas melhores condições de criopreservação, tanto para *B. orbignyanus* como *P. mangurus*.

A construção de banco genético *in vitro* de células germinativas é uma ferramenta essencial para futuras ações conservacionistas, principalmente para as espécies em perigo de extinção. Estas células podem ser criopreservadas e utilizadas em transplante para geração de quimera germinativa, como medida de conservação.

7. Conclusão

As espermatogônias-tronco de *Pseudopimelodus mangurus* obtidas pelo gradiente de densidade de Percoll apresentaram concentração satisfatória para as etapas de transplante e criopreservação. Além disso, o grau de pureza foi próximo dos obtidos na etapa de purificação de espermatogônias-tronco para outras espécies. A pureza das

espermatogônias-tronco foi aumentada em torno de 6% com a adição da etapa do plaqueamento diferencial. A análise microscópica da morfologia celular para distinguir espermatogônia-tronco dos outros tipos celulares, associada com a atividade da fosfatase alcalina e expressão relativa de *ddx4*, confirmou a identidade das células purificadas como células tronco (espermatogônia-tronco). A criopreservação das espermatogônias-tronco sob diferentes crioprotetores e molaridades permitiu eleger o propanediol a 1 M como o mais adequado para o armazenamento das espermatogônias-tronco a longo prazo. Nesta condição, foi verificada alta viabilidade e integridade celular. Estes resultados foram essenciais para o estabelecimento das condições para a geração de banco genético de espermatogônia-tronco de bagre sapo, visando uma futura ação de reconstituição desta espécie, em caso de extinção. Esses resultados não só servirão para o transplante no espaço germinativo do receptor *Astyanax altiparanae* como também pode se tornar um modelo de congelamento desse tipo celular em Siluriformes continentais, contribuindo para o conjunto de técnicas voltadas à conservação da ictiofauna.

Capítulo 2. Esterilização química e imunossupressão de *Astyanax altiparanae* triploides

Resumo

Neste capítulo foram abordados os estudos prévios necessários para a utilização de receptores no transplante de espermatogônias-tronco com a utilização do imunossupressor ciclosporina A (CsA). Foram avaliados os efeitos tóxicos da CsA *in vitro* (cultura de leucócitos de *Astyanax altiparanae*) e *in vivo* (*A. altiparanae*) e, visando adequar a concentração de CsA a ser utilizada que possa causar a imunossupressão e menores efeitos deletérios nos receptores. Leucócitos de isolados e cultivados sob diferentes concentrações de CsA, sendo avaliadas a viabilidade e concentração leucocitária. Juvenis triploides de *A. altiparanae* foram esterilizados com busulfan. Peixes esterilizados e não esterilizados foram considerados grupos controles sem injeção de CsA, sendo coletados rim cranial para análise histológica e molecular, gônada para análise histológica e sangue para esfregaço. Dois grupos de peixes esterilizados foram submetidos a dose única de diferentes doses de CsA e um grupo controle foi injetado com emulsão sem CsA. Nos dias 5 e 10 após a administração de CsA, foram realizadas coletas das amostras. Nas análises de cultura *in vitro* foram observadas diferenças na viabilidade e concentrações leucocitárias entre os tratamentos em 24 e 48 horas de cultivo. A menor concentração CsA propiciou maior viabilidade dos leucócitos e redução significativa na concentração de leucócitos, verificada 48 horas pós cultura. No experimento *in vivo* foi observado redução da expressão relativa de *interleucina-1 β* em rim cranial de animais tratados com CsA em relação ao controle administrado com emulsão e aquele esterilizado sem injeção de CsA. Não foi possível determinar a expressão da *interleucina-1 β* no controle não esterilizado. A maior dosagem de CsA permitiu a redução da expressão de *interleucina-1 β* por maior período. Não houve mudança na composição celular de rim cranial e gonadal com a imunossupressão, tampouco diferença estatística de redução na proporção de leucócitos em esfregaço sanguíneo, embora anemia hemolítica tenha sido observada. A manipulação cromossômica associada a esterilização química proporcionou a depleção das células germinativas. Estes resultados prévios são importantes para avaliação de imunossupressor quanto a rejeição do transplante de espermatogônias em receptores triploides de *A. altiparanae* esterilizados quimicamente.

8. Materiais e Métodos

8.1. Indução à triploidização em *A. altiparanae*

Machos e fêmeas de *A. altiparanae* foram capturados em tanques nas instalações do CEPTA/ICMBio, selecionados conforme características sexuais secundárias e submetidos à indução hormonal, com duas doses de extrato bruto de hipófise de carpa maceradas e diluídas em solução fisiológica (NaCl a 0,9%), aplicadas na base da nadadeira peitoral. Nas fêmeas foram administradas duas doses, sendo a primeira na dosagem de 0,5 mg/kg e, seis horas depois, aplicada a segunda dosagem de 5 mg/kg. Os machos receberam dose única de 1,0 a 2,0 mg/kg, no mesmo momento da segunda dose nas fêmeas. Seis horas após a indução hormonal, os reprodutores foram anestesiados em 100 mg/L de eugenol para a extrusão de gametas. Os oócitos das fêmeas foram extrusados manualmente em recipientes secos revestidos com plástico PVC. Os machos foram anestesiados e seu sêmen foi extraído com auxílio de pipetador e posto em 400 µL de solução imobilizadora, solução de Ringer modificada (128,3 mM de NaCl, 2,6 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl₂, 2,1 mM de MgCl₂ e 2,4 mM de NaHCO₃). Em seguida, à massa de oócitos foram adicionados 200 µL de sêmen liberado no meio imobilizador. Para ativar a motilidade espermática e permitir a fertilização, adicionou-se água e fez-se movimentos circulares durante um minuto. Em seguida, para a indução à triploidização por choque de temperatura, os ovos fertilizados foram postos em peneira na água a 26°C até 2 minutos após a fertilização e transferidos para a água a 40°C durante 2 minutos. Finalmente, os ovos foram retornados a 26°C. Cinco lotes de larvas triploides foram produzidos e mantidos em aquário de 40 L, com temperatura de 28°C e aeração constante. Desde o primeiro dia de abertura bucal, que ocorre 19 horas após a eclosão (hpe), as larvas foram alimentadas diariamente com microcrustáceos *Artemia salina*, até que, dez dias após a eclosão, foram soltas em tanques de alvenaria e alimentadas com ração comercial. O crescimento dos animais foi acompanhado até que completassem dois meses.

8.2. Esterilização química de juvenis triploides de *A. altiparanae*

Dois meses após a reprodução dos triploides de *A. altiparanae*, 2 grupos de 10 machos foram selecionados e aclimatados em aquários de 40 L com aeração constante e submetidos ao aumento gradual de temperatura da água, até que se atingisse 35°C. A confirmação dos indivíduos triploides foi realizada utilizando citometria de fluxo, conforme descrito por XAVIER et al. (2017). Os animais foram anestesiados em solução de eugenol a 100 mg/L, coletado uma pequena parte da nadadeira caudal de cada animal e transferidos individualmente para um microtubo de centrífuga de 1,5 mL, contendo 120 µL de solução detergente (9,53 mM de MgSO₄·7 H₂O; 47,67 mM de KCl; 15 mM de Tris em pH 8,0; 74 mM de sacarose e Triton a 0,6%). As amostras de nadadeiras foram incubadas por 10 minutos nesta solução. Posteriormente, foram adicionando 800 µL de solução de DAPI a 0,01% (4,6 dimidinae 2 phenylidone di-hydrochloride) preparados em D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Sigma #D5773, St. Louis, USA) para a coloração dos núcleos celulares. As amostras foram filtradas em filtros de nylon de 30 µm e analisadas por citometria de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer, Partec, GmbH, Alemanha). Dois exemplares do período de aclimação, isto é, de antes do aumento de temperatura até 35°C, foram capturados, eutanasiados em solução de eugenol, e suas gônadas excisadas por abertura ventral. As gônadas foram imersas em solução fixadora de Bouin por 24 horas, trocada por etanol a 70% diariamente. Após dois dias no etanol a 70%, as gônadas foram submetidas às coletas de pequenas porções representativas, que são partes da gônada que passariam por técnicas histológicas convencionais e permitiriam a visualização da sua composição histológica geral. Esta amostragem foi realizada como controle do estágio de desenvolvimento gonadal antes do início da esterilização química.

O experimento de esterilização química por busulfan foi realizado segundo LÓPEZ (2022). Os peixes foram aclimatados a 28°C durante uma semana antes do início do experimento e a temperatura da água foi aumentada um grau por dia até atingir 35°C. Os animais permaneceram sob essa temperatura por uma semana e, posteriormente, foram iniciadas as administrações de busulfan. As aplicações foram realizadas via injeção na cavidade intracelomática, sendo realizado um total de três administrações de busulfan na concentração de 50 mg/kg de peixe, com intervalos de 7 dias entre cada aplicação. Dez dias após a última aplicação, a temperatura foi reduzida um grau por dia até atingir a temperatura de 28°C.

Para esterilização química dos peixes, foi preparada uma solução estoque de busulfan a 100 mg/mL em DMSO. No uso, esta solução foi mantida a 37°C em banho seco, para a dissolução completa do agente. A solução de uso foi preparada pela adição de 20 µL da solução de busulfan estoque em 980 µL de solução de Ringer (2 mg/mL) e mantidos a 37°C em banho seco. Vinte animais foram anestesiados por imersão em solução de eugenol e a solução de uso de busulfan, a 37°C, foi injetada na cavidade celomática dos animais, na concentração de 50 mg/kg (LÓPEZ, 2022). Em seguida, os animais foram repostos nos aquários a 35°C. Sete dias depois, coletou-se dois exemplares de lambari e fixou-se novamente as gônadas para análises histológicas. O mesmo procedimento se repetiu na segunda e terceira administrações de busulfan. Um total de três aplicações de busulfan foram realizadas, com intervalo de sete dias entre cada administração.

As gônadas provenientes de peixes anteriores ao período de aclimação (a 35°C e antes do tratamento com busulfan) e de peixes tratados com busulfan foram submetidas ao procedimento de inclusão, corte e montagem das lâminas, como descrito no subtítulo “4.1. *Análise da composição histológica do testículo de P. manguru do Capítulo 1*”. Os cortes histológicos foram observados em um microscópio óptico (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e as imagens capturadas com o uso de uma câmera fotográfica (Nikon DSRi2, Nikon, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio.

8.3. Isolamento de leucócitos de *A. altiparanae*

Aproximadamente 2 mL de sangue periférico foram coletados via punção da veia caudal e postos em um tubo com 30 µL (15 µL/mL, seguindo a recomendação de ISHIKAWA et al., 2010) do agente anticoagulante Na₂EDTA (Sigma #317810, Saint Louis, EUA) na concentração de 0,5 M a 4°C. A extração se procedeu sem aplicação de solução anestésica nos animais, para que a pressão sanguínea fosse alta o suficiente para a sua rápida punção. O sangue foi diluído na proporção de 1:1 em meio RPMI 1640 + GlutaMAX™ (Sigma #R6504, Saint Louis, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 4 mL da solução sanguínea foram depositados sobre 4 mL de meio de separação de densidade Histopaque©- 1077 (Sigma #H8889, Saint Louis, EUA) para o isolamento dos leucócitos. A amostra foi centrifugada (Centrifuge 5702 – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 700 x g durante 30 minutos, e o botão leucocitário (Figura 13) foi recuperado com auxílio de uma pipeta de 100 µL, transferido para um novo tubo. 1

mL de meio RPMI enriquecido foi adicionado e o produto novamente centrifugado a 300 x g durante 5 minutos para sua lavagem. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de RPMI enriquecido foram adicionados ao material leucocitário, que foi, em seguida, ressuspensão. 10 µL de material foram coletados e analisados quanto à concentração celular e viabilidade utilizando câmara hematómica de Neubauer e microscópio (Nikon-Eclipse Ni). Os leucócitos foram visualizados (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e fotografados (Nikon DSRi2, Nikon, Tóquio, Japão). A concentração celular foi reajustada em 10^4 células/mL.

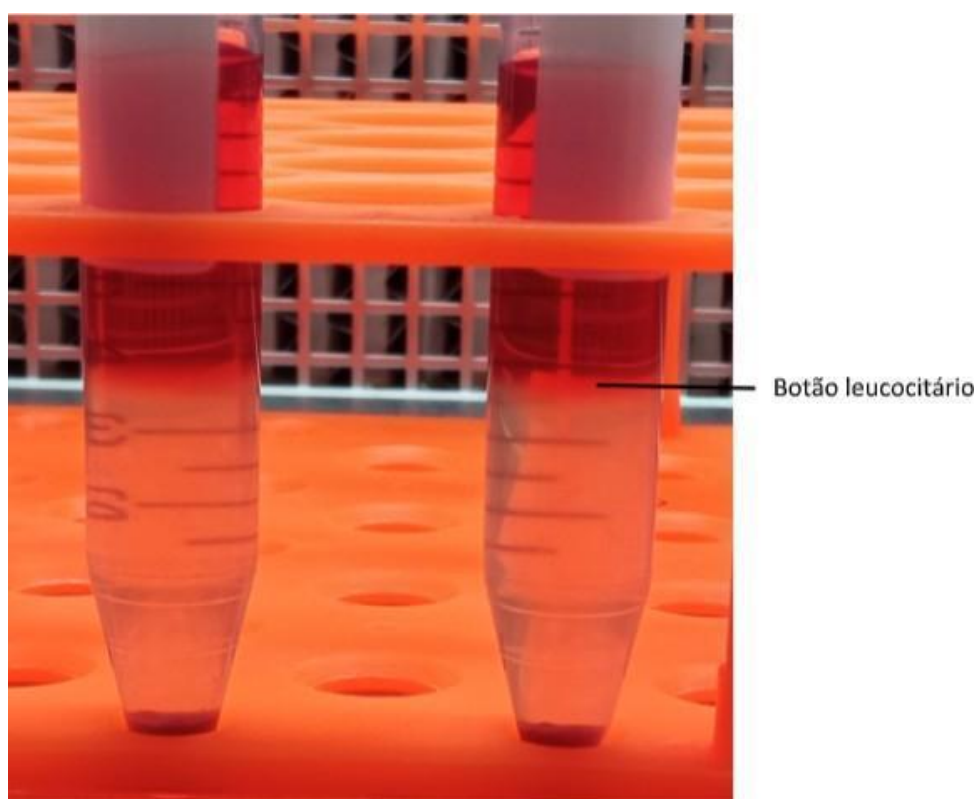


Figura 13. Botão leucocitário isolado da solução sanguínea.

8.4. Cultura *in vitro* de leucócitos com CsA

Os leucócitos foram cultivados em três concentrações de CsA de 0,10 µg/µL, 0,15 µg/µL e 0,2 µg/µL, sendo estas concentrações baseadas no trabalho realizado com leucócito de *Oncorhynchus mykiss* (YOSHINAGA, 2018). Uma análise controle foi incluída, sem adição de CsA. Para a cultura, foram utilizadas 4 séries de 4 poços de cultura, em uma placa com 48 poços (Greiner Bio-One Brasil), para as três concentrações testadas e para o controle. Uma solução estoque de CsA a 2 mg/mL foi

preparada diluindo-a em etanol e em seguida em RPMI. Para cada série de poços, 100 µL de solução celular foram depositados em 100 µL de solução de CsA nas diferentes concentrações, para obter as concentrações finais de 0,10 µg/µL, 0,15 µg/µL e 0,2 µg/µL. Na série controle, foram adicionados 100 µL de RPMI enriquecido a 100 µL de solução celular. A placa de cultura foi mantida em uma incubadora de CO₂ (Sanyo COM-18AIC (UV) CO₂ Incubator, SANYO Electric Co., Ltd, Japão), com atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade, a 30°C.

8.4.1. Viabilidade celular após a administração *in vitro* de CsA

A viabilidade celular dos leucócitos, sob cada concentração, foi analisada em 24 e 48 horas após o início da cultura, sendo coletado 10 µL de solução de cada poço e corados com 2 µL de azul de Trypan a 0,4% (Sigma #T8154, Saint Louis, EUA). As células foram depositadas sobre a câmara de Neubauer e contadas com uso de microscópio, em quadrantes aleatórios, de preferência, seguindo o padrão de contagem dos 4 quadrantes marginais e o quadrante do meio.

8.4.2. Análises estatísticas

As viabilidades foram submetidas ao teste ANOVA ($p < 0,05$) e Tukey para múltiplas comparações no programa PAST 4.03.

8.5. Administração *in vivo* de CsA em juvenis triploides de *A. altiparanae*

Nesse experimento, ilustrado pela Figura 14, os peixes foram analisados quanto (i) expressão da *interleucina-1β* em amostras de rim cranial, (ii) à possível influência da CsA na quantidade e integridade das células hematopoiéticas desse órgão, sustentada a diminuição de células brancas em circulação no sangue (iii) na produção de células germinativas pelas gônadas e (iv) na quantidade de leucócitos em amostras de esfregaço sanguíneo.

Na primeira coleta (dia do início administração da CsA), dois grupos de três peixes triploides cada foram analisados: não tratados com busulfan e os tratados com busulfan após a terceira aplicação, cinco dias depois de aclimatação a 28°C. Esses dois

conjuntos foram considerados grupos controles sem administração de CsA, com e sem a administração do agente químico busulfan. Os animais foram eutanasiados em uma solução anestésica de eugenol. Em seguida, abriu-se longitudinalmente a sua região ventral. Suas gônadas foram excisadas e imediatamente imersas em solução fixadora de Bouin, substituída no dia seguinte por etanol a 70%. Fragmentos do rim cranial dos peixes também foram coletados e fixados e partes desse órgão foram congeladas a -80°C para posterior extração de RNA. Os animais eutanasiados foram catalogados e armazenados em um freezer adequado a -20°C .

No mesmo dia, três grupos constituídos de oito peixes esterilizados quimicamente com busulfan foram submetidos a tratamentos com CsA, baseados no trabalho de YOSHINAGA (2018): o controle com emulsão sem o imunossupressor e os grupos administradas CsA nas dosagens de 20 mg/kg e de 40 mg/kg. Três peixes de cada tratamento foram coletados no quinto e décimo dia após a injeção da CsA e emulsão. Os grupos foram constituídos por dois animais excedentes para garantia de que a amostragem de animais fosse o suficiente, em virtude da nefrotoxicidade e possível letalidade das dosagens de CsA. Sangue da veia caudal de cada animal foi coletado com uma seringa de insulina e fez-se um esfregaço sanguíneo.

A emulsão foi preparada diluindo-se 0,5 mL de soro fisiológico em 0,5 mL de álcool etílico absoluto, e homogeneizando o produto em óleo de peixe, na proporção de 1:1. Para a homogeneização, a solução foi agitada em Vórtex durante dez minutos.

Para a preparação das soluções de CsA a 20 e 40 mg/kg, 2 e 4 mg do reagente/mL (CsA/1 parte de solução fisiológica: 1 parte de etanol absoluto), respectivamente, foram homogeneizados em solução emulsificante para se produzir o imunossupressor injetável (1 parte da solução de CsA : 1 parte de óleo de peixe). Os volumes da emulsão e CsA em emulsão a 20 mg/kg e a 40 mg/kg foram injetados nos animais de acordo com a massa de cada animal, utilizando uma seringa de insulina na cavidade celomática dos peixes dos grupos controle e tratados com CsA, abaixo da nadadeira pélvica. Os animais foram mantidos e alimentados em aquários de 40 L a 28°C com aeração constante, até que se completassem cinco dias. A primeira coleta, realizada cinco dias após a injeção, se sucedeu coletando três peixes de cada tratamento, sendo amostradas as suas gônadas, sangue e rim cranial, como descrito para os controles com e sem busulfan, sem CsA. A segunda coleta foi realizada no décimo dia após a administração de CsA e emulsão.

Após secas, as amostras de esfregaço sanguíneo foram coradas com corante azul de

Giemsa. Para isso, fixou-se as lâminas com esfregaço sob etanol absoluto por cinco minutos, e depois corou-se as mesmas em solução de Giemsa por 30 minutos, com 2 gotas do corante por mL de água destilada. Com leucócitos foram submetidos à contagem microscópica direta, seguindo a metodologia descrita por RANZANI & PAIVA (1981), e segregados visualmente conforme as diferenças morfológicas de cada população leucocitária (aspectos do núcleo e da disposição granular do citoplasma), ao longo do segundo terço do esfregaço. Os percentuais de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos dos esfregaços de cada tratamento foram anotados.

Após alguns dias da substituição de fixador Bouin por etanol a 70%, as gônadas e frações de rim cranial foram submetidas ao processamento histológico, como descrito no subtítulo 4.1. “*Análise histológica do testículo de P. mangurus*” do Capítulo I”.

O tecido linfo-hematopoiético do rim cranial, com células indiferenciadas que originam também as células leucocitárias, foi analisado quanto à morfometria através do programa *ImageJ*. Para isso, as imagens foram linearizadas automaticamente pelo *software*, transformando-as em níveis de cinza, e as células foram contadas manualmente. Com a densidade celular ($\text{cc}/\mu\text{m}^2$) obtida, foi possível analisar se houve diferença quanto a esse aspecto entre os diferentes tratamentos de CsA no rim cranial, verificando se o imunossupressor afetaria também a proliferação celular no órgão hematopoiético. Foi possível obter também cortes histológicos do estroma renal, com os túbulos proximal e distal.

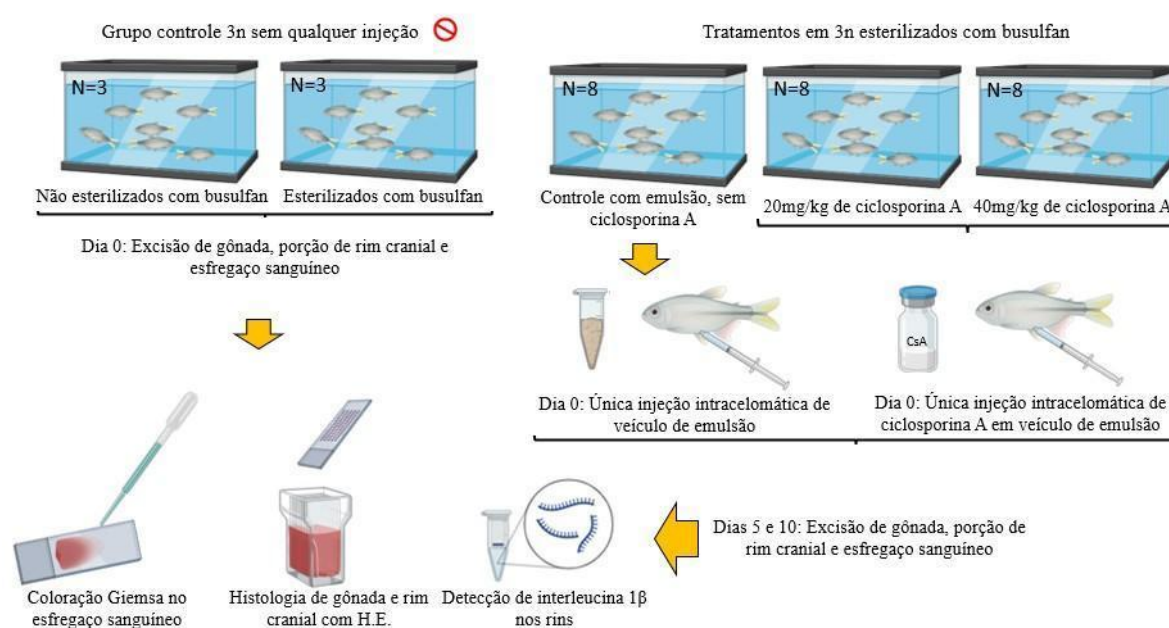


Figura 14. Representação ilustrativa do experimento de administração *in vivo* de CsA

em juvenis de *A. altiparanae* triploides esterilizados quimicamente. Imagem montada no programa BioRender.

8.6. Avaliação da expressão da *interleucina-1 β* em rins de animais tratados com CsA

A avaliação da expressão do gene *interleucina-1 β* foi realizada utilizando a PCR convencional e em tempo real.

8.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA de amostras de rim cranial de *A. altiparanae* tratados com CsA

Para a avaliação da expressão da *interleucina-1 β* em rins de *A. altiparanae* tratados com CsA, as amostras de RNA total de três animais provenientes de cada coleta foram utilizadas para formar um “pool” representativo de cada amostra. Cada “pool” foi constituído com a mesma concentração de RNA oriunda de cada indivíduo amostrado. A extração de RNA total e produção de cDNA de cada amostra de rim cranial foi realizada conforme descrito para as amostras gonadais e espermatogoniais de *P. mangurus*, nos subtítulos 4.4.1. “Extração de RNA de amostras gonadal e espermatogoniais de *P. mangurus*” e 4.4.2. “Produção de cDNA a partir do RNA de amostras gonadal e espermatogoniais de *P. mangurus*” do Capítulo 1.

8.6.2. Análise da expressão da *interleucina-1 β* em rins craniais de *A. altiparanae* tratados com CsA – PCR convencional

As reações de PCR foram preparadas como descrita no subtítulo 4.4.3 “Avaliação da expressão de *ddx4* por PCR convencional” do Capítulo 1. Foram utilizados primers do gene *interleucina-1 β* e do gene endógeno do *rRNA 18S* de *A. altiparanae* apresentados na Tabela 5. A sequências dos primers para *rRNA 18S* e *β -actina* foram desenhados para lambari e previamente utilizado em nosso laboratório, enquanto que as sequências dos primers para *interleucina-1 β* foram aquelas publicadas (LEVY-PEREIRA et al., 2021). As amostras de 30 μ L foram submetidas à reação de PCR no termociclador (RotorGene Q, Qiagen) com os seguintes parâmetros de ciclagens: 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos para desnaturação, 55°C durante 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão e um ciclo de 72°C por 10 minutos para extensão final,

seguido de 4°C infinito. A eletroforese foi realizada em solução de TBE 0,5X sob uma tensão constante de 70 V em gel de agarose a 2%. Os produtos das amplificações foram visualizados utilizando um transiluminador UV (Accuris E4000 Smartblue, Benchmark Scientific) e fotografados.

Tabela 5. Sequências de primers utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR convencional e em tempo real.

Primers	Sequências 5'→3'	Amplicon (pb)
<i>rRNA18S-F</i>	GTCTGTGATGCCTTAGATGTC	107
<i>rRNA 18S-R</i>	CGAACGGGTTTAAGCGGATT	
<i>IL-1β-F</i>	CCTCACAGCATGAGGAAGGTGG	105
<i>IL-1β-R</i>	GTGCTCGGTGAACTCTGTGGAG	
β -actina-F	CGTGCTGTCTTCCCATCCA	86
β -actina-R	TCACCAACGTAGCTGTCCTTCTG	

8.6.3. Análise da expressão da interleucina-1 β em rins craniais de *A. altiparanae* tratados com CsA – qPCR

Para realização quantitativa relativa da *interleucina-1 β* em rins de *A. altiparanae* tratados com CsA, foi utilizado os mesmos procedimentos e equipamentos descritos no subtítulo 4.4.4. “Avaliação da expressão relativa de *ddx4*” do Capítulo 1. Neste experimento foram utilizados 200 ng de cDNA de cada amostra para avaliação da expressão gênica relativa.

9. Resultados

9.1. Tratamento de juvenis triploides de *A. altiparanae* com busulfan

Através da análise histológica, foi possível observar a composição celular das gônadas de indivíduos triplóides de *A. altiparanae* (Figura 15A) antes do aumento de temperatura e verificar a ausência de espermatozóides nos ductos seminíferos, demonstrando que a triploidização proporciona a infertilidade em juvenis. Células indiferenciadas, como as espermatogônias-tronco, são distintas visualmente pelo seu maior tamanho, núcleo grande e arredondado predominantemente na região central, bem como são abundantes em eucromatina e heterocromatina identificada por coloração mais acidófila. Nesta análise foi verificada a presença de espermatogônias-tronco nos

testículos dos animais triploides, indicando que a esterilização unicamente por manipulação cromossômica não é efetiva para a realização do transplante de células germinativas, uma vez que as células germinativas constituem uma barreira física em animais adultos para a entrada das células transplantadas nos testículos dos receptores.

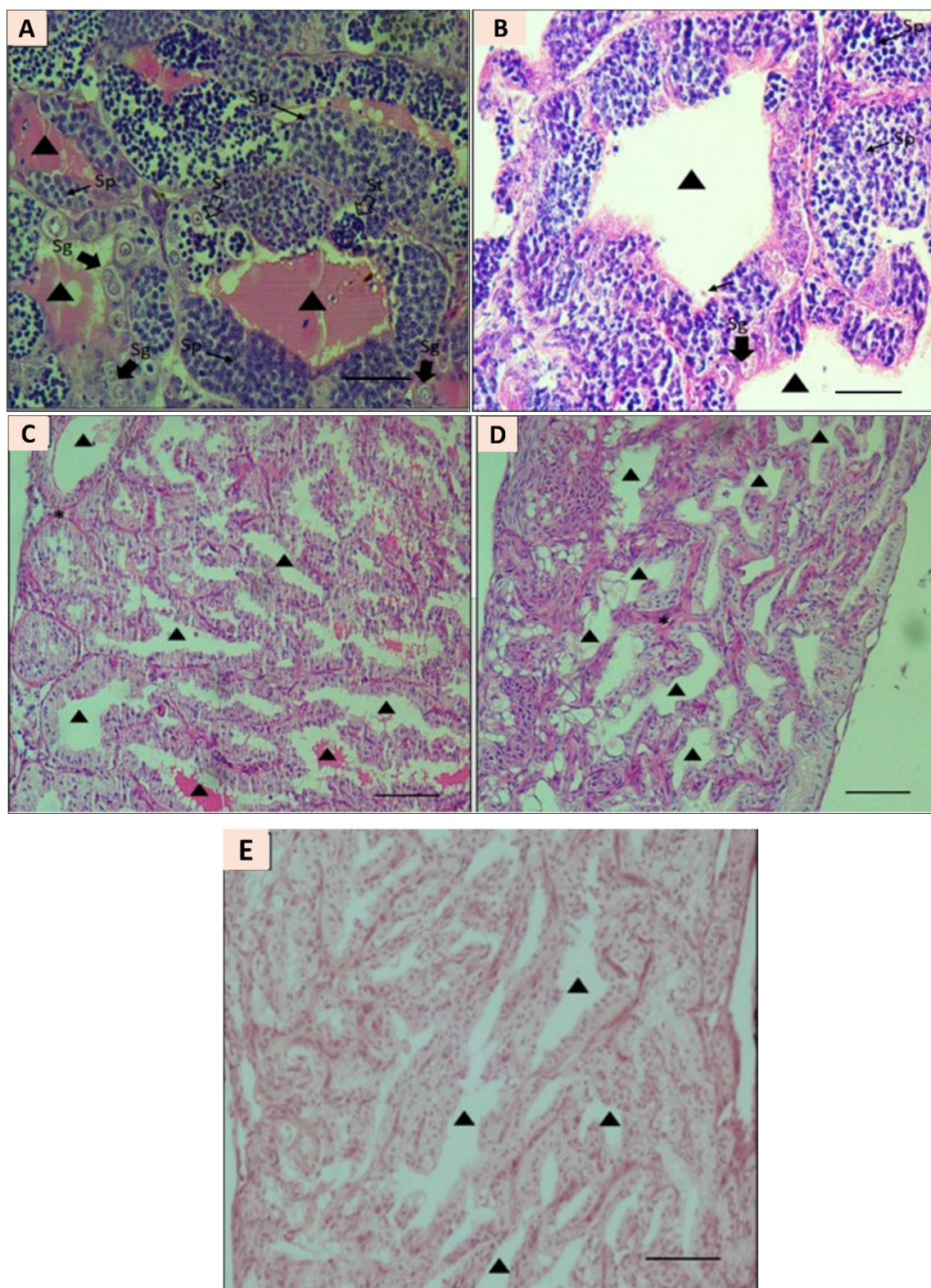


Figura 15. Histologia dos testículos de *A. altiparanae* triploides submetidos à esterilização química com busulfan a 50 mg/kg. **A:** testículo antes do aumento de temperatura, com ninhos contendo algumas espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sp) predominantes, espermatídes (St), conectados com o lúmen (triângulo) do túbulo seminífero sem espermatozóides. **B:** testículo uma semana após o aumento de temperatura. **C:** testículo uma semana após a primeira aplicação de busulfan. **D:** testículo uma semana após a segunda aplicação de busulfan. **E:** testículo uma semana

após a terceira aplicação de busulfan. **A e B:** escala: 50 μm . **C, D e E:** 100 μm .

Algumas espermatogônias se mostram envoltas por prolongamentos citoplasmáticos de células de Sertoli e agrupadas em ninhos em regiões vascularizadas, separadas por tecido intersticial no epitélio germinativo. Há, também, cistos abrigando espermatócitos ricos em heterocromatina basófila, em estágio de metáfase. É possível observar elementos ainda mais diferenciados, as espermátides, fortemente basófilas e de menor tamanho. Observou-se, assim, cistos em diferentes estágios de gametogênese na secção histológica, com elementos e organização correspondentes aos descritos para a espécie (SIQUEIRA-SILVA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2017) e outros caracídeos (ALEXANDRINO et al., 1985; ARAÚJO et al., 2019).

Na análise histológica das gônadas ao longo do tratamento com busulfan, foi possível observar a composição celular das gônadas de machos triploides de *A. altiparane* sob os efeitos do aumento de temperatura unicamente (Figura 15B) e após as três injeções de busulfan (Figuras 15C, 15D e 15E). Além da ausência de espermatozóides, nas três fases do experimento, notou-se uma degradação sucessiva da linhagem germinativa desde as formas mais indiferenciadas, como demonstrado por SIQUEIRA-SILVA et al. (2015), em que temperaturas altas podem ajudar na esterilização de *A. altiparanae* adultos. Após o aumento da temperatura, as gônadas apresentavam algumas espermatogônias entremeadas aos ninhos, em que predominavam espermatócitos.

Nas gônadas após a segunda e terceira doses de busulfan, a estrutura das gônadas era composta aparentemente por células somáticas dos ninhos, envoltas pelo tecido intersticial, sendo possível verificar a ausência de células germinativas, pela coloração dominante de eosina que cora células somáticas do epitélio germinativo em detrimento das células germinativas, que seriam células evidenciadas por hematoxilina, de cor mais escura. As espermatogônias, distintas visualmente das suas formas diferenciadas pelo seu maior tamanho, núcleo grande e arredondado predominantemente na região central (COSTA, 2011), são evidentemente mais escassas após o aumento de temperatura (Figura 14B), em comparação com a temperatura a 28°C, e indetectáveis a partir da primeira dose de busulfan (Figura 15C), indicando que a linhagem germinativa sofreu depleção.

Uma semana após a única injeção CsA, foi observada nos grupos com tratamentos de 20 e 40 mg/kg de CsA a morte de 3 peixes cada, enquanto que para o grupo controle

injetado somente a emulsão, 1 peixe morreu. A nefrotoxicidade do imunossupressor pode ter sido a causa principal da letalidade maior entre os grupos submetidos à sua injeção com CsA.

Visivelmente, não há correlação entre a presença da CsA e a depleção gametogênica de *A. altiparanae*. Na Figura 16 pode ser verificado que não há alterações da estrutura gonadal dos animais tratados com CsA (Figura 16B) em relação ao grupo controle tratado com busulfan (Figura 16A). Entre os cortes histológicos de gônadas dos animais controle tratados ou não com busulfan, foi observado o que já era esperado, pelo experimento anterior de injeção intracelomática do fármaco (LÓPEZ, 2022): houve igual depleção gametogênica naqueles esterilizados quimicamente (nos controles com busulfan e com emulsão e também nos tratados com CsA a 20 e 40 mg/kg) comparada às gônadas do grupo controle sem busulfan, que apresentavam o desenvolvimento normal da linhagem germinativa.

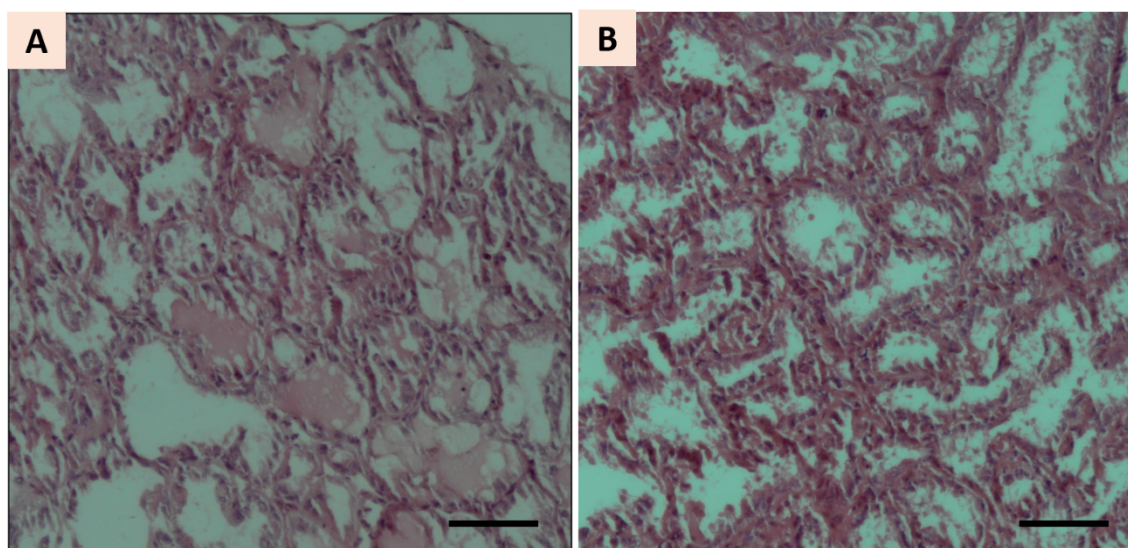


Figura 16. Histologia dos testículos de *A. altiparanae* triploides submetidos à esterilização química com busulfan a 50 mg/kg, não tratado e tratado com CsA. **A:** testículo de indivíduo esterilizado quimicamente sem ser administrado CsA. **B:** testículo de indivíduo esterilizado quimicamente, cinco dias após a administração de 40 mg/kg de CsA. Escala de 100 μ m.

As gônadas de peixes tratados com 20 mg/kg e 40 mg/kg de CsA no décimo dia após a administração não foram coletadas para análises histológicas, pois eram muito pequenas e frágeis ao manuseio.

As gônadas dos grupos triploides esterilizados quimicamente, (i) tratado com CsA,

(ii) tratado apenas com emulsão e (iii) não injetado com emulsão ou imunossupressor (controle com busulfan), eram diminutas, com menor massa e muitas vezes presentes em um só lado da cavidade intracelomática, em contraste com o grupo controle triploide não esterilizado quimicamente. Estes resultados indicaram que a temperatura aliada à ação do busulfan esteriliza mais eficientemente em relação ao aumento de temperatura unicamente (SIQUEIRA-SILVA et al., 2019; LÓPEZ, 2022), e que a CsA não influencia na depleção gametogênica.

9.2. Cultura *in vitro* de leucócitos de *A. altiparanae*

A concentração celular de leucócitos após a recuperação do botão leucocitário foi de $1,17 \times 10^6$ cc/mL, com viabilidade celular média de 91,14%. Após a diluição em RPMI enriquecido, a concentração foi ajustada para $4,5 \times 10^5$ cc/mL. As viabilidades celulares mensuradas 24 e 48 horas após o cultivo estão apresentadas na Figura 16.

Na análise de viabilidade celular, foi observada diferença estatística entre os tratamentos 24 e 48 horas de cultivo ($p=0,0038$) e, dentro dos dois grupos, as repetições foram homogêneas. Diferenças estatísticas foram encontradas também quanto à viabilidade celular 24 horas após o cultivo, a $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, eram semelhantemente altas em relação à maior concentração, de $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. 48 horas após o cultivo, as viabilidades celulares caíram alguns décimos, sendo que a menor concentração ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) proporcionou a maior viabilidade celular nesse intervalo, sugerindo ser esta a concentração mais segura para o emprego *in vitro*. As concentrações leucocitárias 24 e 48 horas após o cultivo também diminuíram (Figura 17), sugerindo que em 24 horas após o tratamento ocorre a maior diminuição da concentração leucocitária, com pouca variação da concentração após o tratamento. No grupo controle, o decréscimo acentuado da concentração leucocitária ocorreu 48 horas após o início do cultivo.

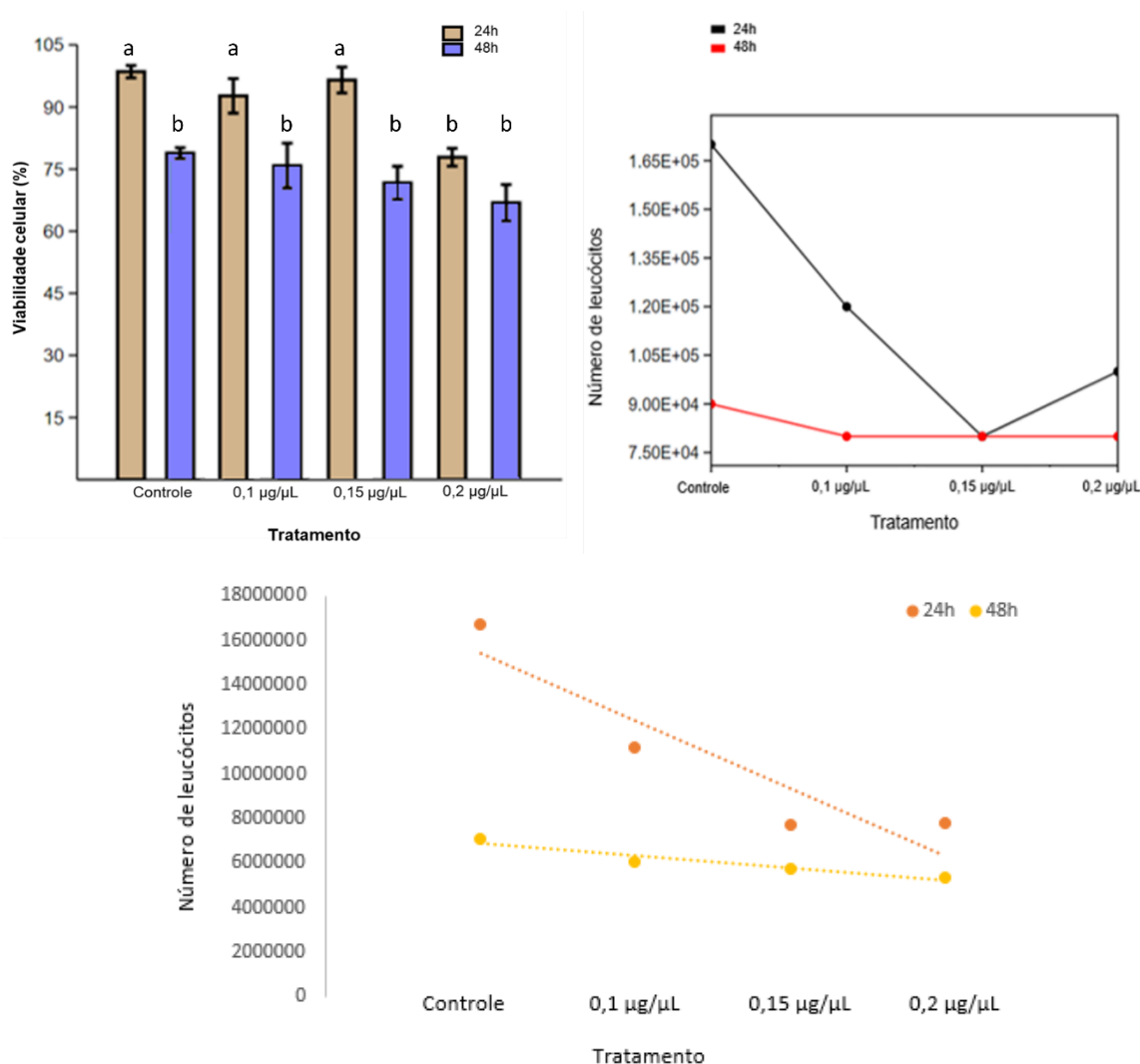


Figura 17. Gráficos de viabilidades e concentrações leucocitárias sob diferentes concentrações de CsA *in vitro*. À esquerda, viabilidades celulares (%) 24 h e 48 h após o cultivo de leucócitos sob as diferentes concentrações de CsA (0,1, 0,15, 0,2 µg/µL) e do grupo controle sem CsA. À direita, concentrações leucocitárias 24 e 48 h após a cultura *in vitro* com CsA (0,1, 0,15, 0,2 µg/µL) e do grupo controle sem CsA. Embaixo, a resposta do número de leucócitos em função do tratamento de CsA, em regressão linear.

A maior concentração de CsA, neste caso, causou a menor viabilidade celular. As duas menores concentrações, no entanto, apresentaram viabilidades semelhantes, sendo a concentração de 0,1 µg/µL menos danosa no intervalo de 48 horas após o cultivo celular. A análise *in vitro* pode ser utilizada como base para a administração *in vivo*. Considerando a concentração mais baixa como a mais adequada (0,1 µg/µL correspondente a 0,1 g/L), poderia ser sugerido a concentração para teste *in vivo* de 100 mg/kg (considerando L igual a kg), a qual é a superior a utilizada nos testes *in vivo* neste trabalho.

9.3. Análise histológica dos rins de *A. altiparanae* tratados com CsA

Não foi possível coletar amostras de rim cranial do tratamento de 40 mg/kg do dia 10 para histologia, pois o órgão nesse tratamento e dia parecia se dismantelar com a coleta, aparentando se liquefazer.

As análises histológicas dos tecidos hematopoiéticos do rim cranial (Figura 18A, 18C e 18E) e o parênquima renal, com túbulos contorcidos proximais e distais (Figura 18B, 18D e 18F) foram realizadas para os grupos controle (com emulsão) e os tratados com CsA. Através de análises executadas no programa *ImageJ*, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas de densidade celular entre os tratamentos ($p=0,1647$), demonstrando que a CsA não desestimula a hematopoese. Apesar de a estrutura do rim cranial também não ter sido alterada com a aplicação do imunossupressor, suas solidez e integridade foram comprometidas em relação ao órgão dos animais controles tratados apenas com emulsão ou dos controles sem qualquer aplicação.

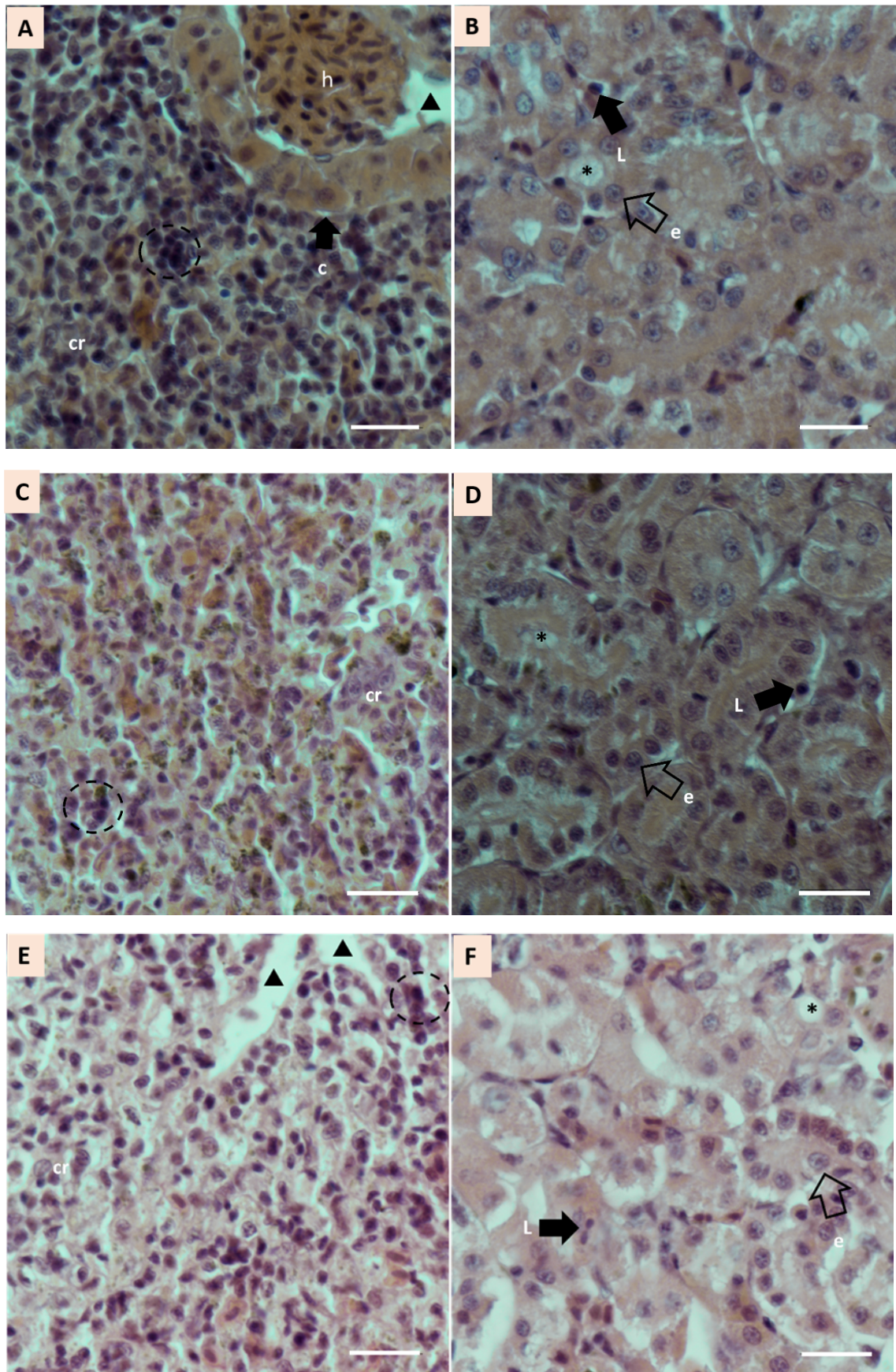


Figura 18: Lâmina histológica de rim cranial de *Astyanax altiparanae* triploides sem CsA. **A, C e E:** Tecido hematopoiético de controle sem emulsão, controle com emulsão e com CsA (40 mg/kg do dia 5), respectivamente, com sinusoide (cabeça de seta) e aglomerado de hemácias (h), revestido por células inter-renais cúbicas (seta cheia). Centros melanomacrofágicos (círculo pontilhado) e célula compatível com célula reticular (cr) em meio às células inter-renais do tecido hematopoiético do rim cranial. **B, D e F:** estroma renal no rim cranial de *A. altiparanae* de controle sem emulsão, controle com emulsão e com CsA (40 mg/kg do dia 5), respectivamente, com túbulo contorcido proximal (asterisco) com células epiteliais simples (seta vazia) e linfócitos (seta cheia). Escala de 50 µm.

9.4. Esfregaço sanguíneo

Meio às hemácias em forma de disco e de coloração rósea, o tipo leucocitário mais identificado era o dos linfócitos, com núcleo arredondado e cromatina densa, seguidos dos neutrófilos, apresentando de 3 a 5 lóbulos conectados por uma ponte de cromatina. Os eosinófilos, distintos pela presença de 2 lóbulos, os basófilos, com ponte de cromatina mais espessa que o dos outros tipos celulares e rico em granulócitos, e os monócitos, de volume maior e núcleo grande com formato de ferradura, foram mais dificilmente achados. As proporções dos tipos leucocitários nos esfregaços sanguíneos de cada tratamento são apresentadas na Figura 19, e a visualização, na Figura 20. Não foi possível fazer o esfregaço sanguíneo do peixe sobrevivente ao décimo dia tratado com 20 mg/kg de CsA, mesmo recorrendo à coleta diretamente da cavidade intracelomática após a excisão do rim cranial, pois o sangue era muito escasso e ralo, de cor rosada. É importante destacar que no tratamento de 40 mg/kg desse dia o sangue periférico, de difícil punção, também apresentava essas características.

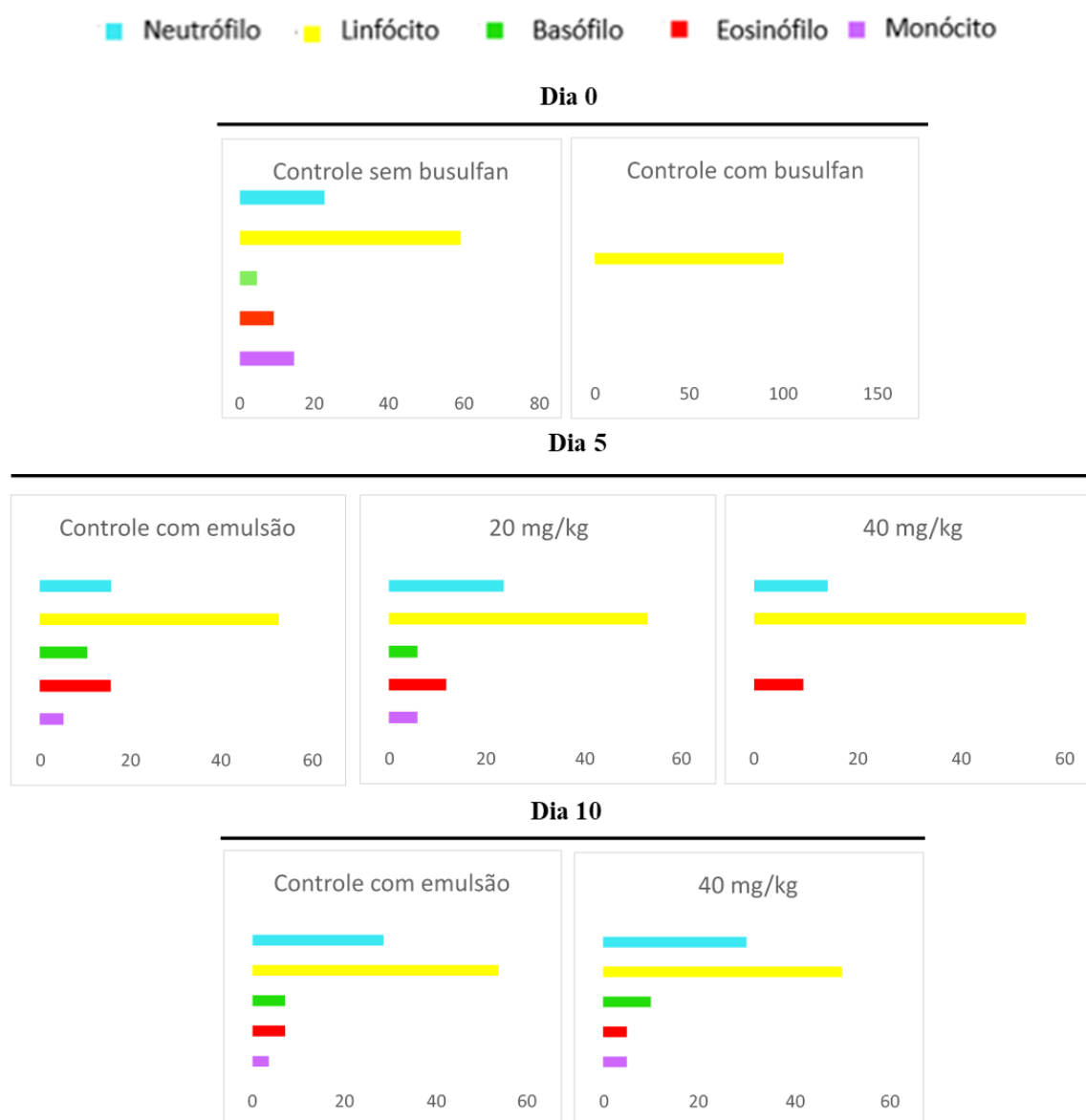


Figura 19. Efeito do tratamento com CsA em *A. altiparanae* dos dias 0 (controles sem qualquer aplicação), 5 e 10 (controle com veículo de emulsão e tratamento com CsA) sobre as proporções dos tipos leucocitários no esfregaço sanguíneo.

As células leucocitárias foram mais dificilmente detectadas nos tratamentos de 20 (Figura 20D) e 40 mg/kg (Figura 20E) de CsA em relação aos controles com (Figura 20A) e sem busulfan (Figura 20B) e com emulsão (Figura 20C), uma vez que o sangue coletado era evidentemente mais ralo e escasso, o que pode ter sido um dos efeitos colaterais descrito em humanos.

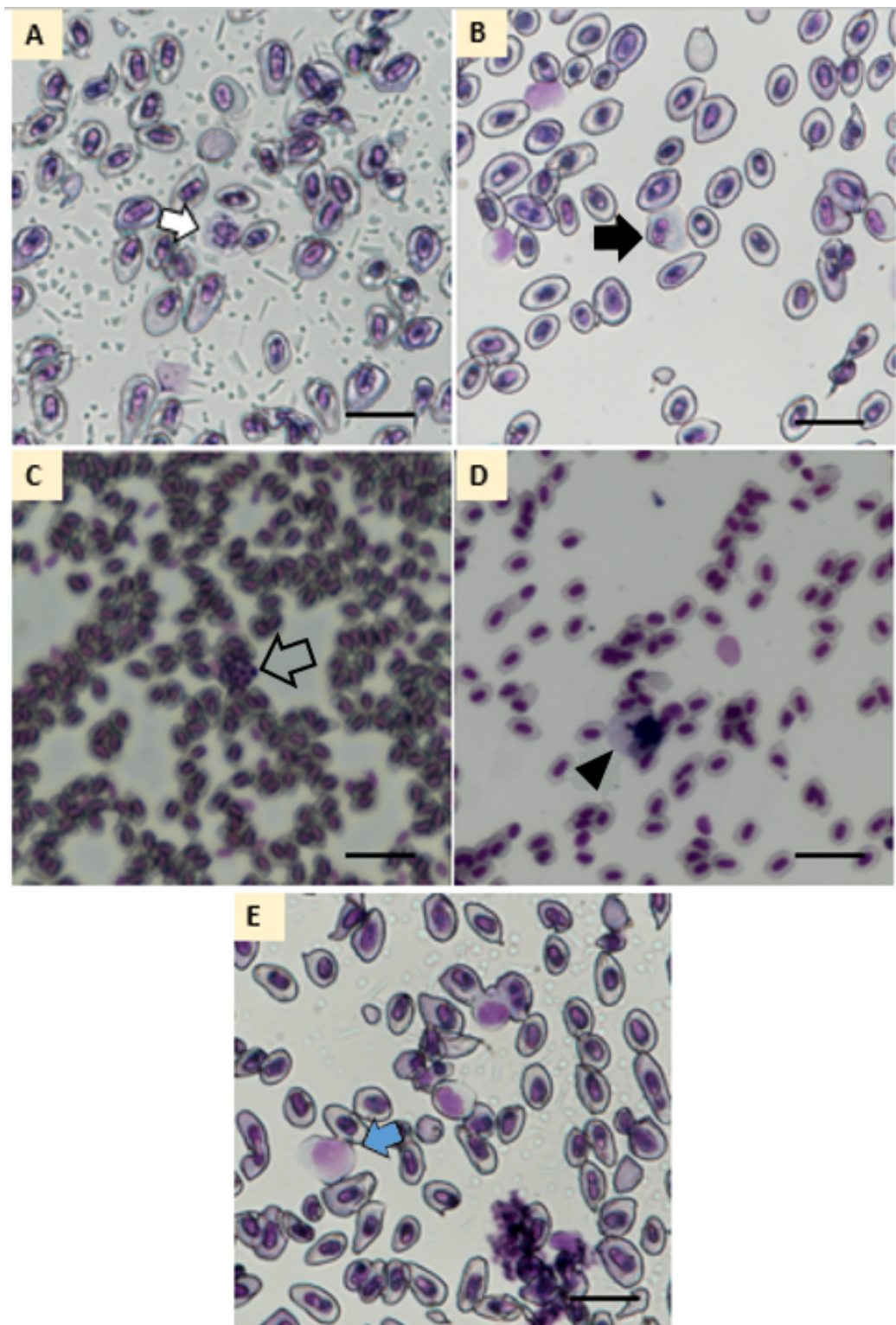


Figura 20. Esfregaços sanguíneos oriundos dos diferentes tratamentos do experimento de administração *in vivo* de CsA, submetidos ao leucograma. **A:** Seta branca: granulócito. **B:** Seta branca: eosinófilo. **C:** Seta vazia: neutrófilo. **D:** Cabeça de seta: monócito. **E:** Seta azul: linfócito. Escala de 200 μm .

9.5. Análise da expressão de *interleucina-1 β* em rins craniais de *A. altiparanae* tratados com CsA – PCR convencional

A extração de RNAs totais de rim cranial dos dias 0, 5 e 10 foi bem-sucedida. As concentrações e as absorbâncias para a razão comprimento de onda A260/A280 da extração de RNA obtidas no espectrofotômetro são especificadas na Tabela 6, indicando um grau de pureza aceitável, uma vez que o valor referencial é 2. As absorbâncias para o comprimento de onda A260 (equivalente ao pico de densidade óptica para RNA, no qual uma leitura igual a 1 equivale a 40 $\mu\text{g RNA}/\mu\text{L}$) correspondem a concentrações satisfatórias de RNA extraído, exceto nos controles sem e com busulfan para os indivíduos 2, do dia 0, e no controle com emulsão para o indivíduo 1 e 20 mg/kg para o indivíduo 2, do dia 5.

Tabela 6. Concentrações (ng/ μL) e determinações de pureza (A260/280) de RNAs de rim cranial coletados nos dias 0, 5 e 10 do experimento.

Dia 0	Concentração (ng/ μL)	A260/280
Controle sem busulfan 1	706,8	1,98
Controle sem busulfan 2	52,7	1,7
Controle sem busulfan 3	532,9	1,85
Controle com busulfan 1	481,4	2,01
Controle com busulfan 2	13,6	1,46
Controle com busulfan 3	246,5	1,97
Dia 5		
Controle com emulsão 1	44,1	1,6
Controle com emulsão 2	416,8	1,98
Controle com emulsão 3	88,5	1,72
20 mg/kg 1	316,4	1,88
20 mg/kg 2	34,2	1,46
40 mg/kg 1	241,2	1,86
40 mg/kg 2	732,5	1,97
Dia 10		
Controle com emulsão 1	246,2	1,82
Controle com emulsão 2	297,8	1,76
Controle com emulsão 3	303,3	1,86
20 mg/kg	897,7	1,97
40 mg/kg	580,5	1,88

A amplificação do gene *interleucina-1 β* , citocina pró inflamatória crucial para a ativação e proliferação de células T e reguladores do sistema imune inato (KEMENADE, 2009), foi detectada em todas as amostras avaliadas (Figura 21), assim como o gene endógeno *rRNA 18S*. Apenas uma banda de amplificação foi observada para cada gene avaliado, indicando que os primers utilizados foram específicos.

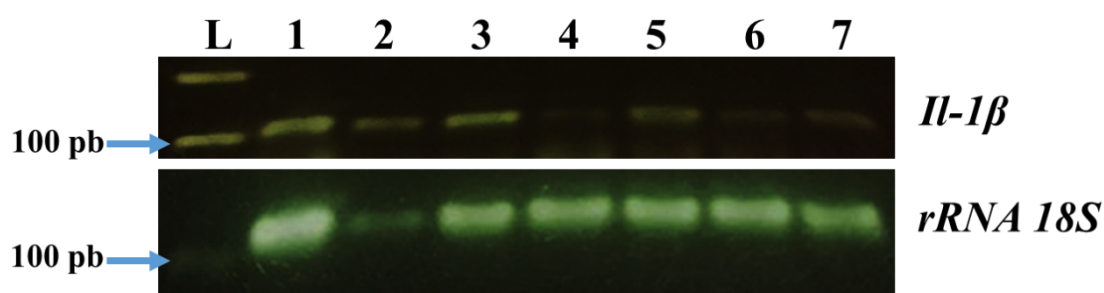


Figura 21. Expressão da *interleucina-1 β* e do endógeno *rRNA 18S* em rim cranial de *A. altiparanae* triploides submetidos ao experimento de imunossupressão com CsA. **L:** ladder 1 kb plus. **1:** grupo controle 3n sem busulfan no início do experimento (dia 0). **2:** grupo controle 3n com busulfan no dia 0. **3:** grupo controle 3n com emulsão 2 do dia 10. **4:** grupo 3n com tratamento de 20 mg/kg de CsA no dia 5. **5:** grupo 3n com tratamento de 20 mg/kg de CsA no dia 10. **6:** grupo 3n com tratamento de 40 mg/kg no dia 5. **7:** grupo 3n com tratamento de 40 mg/kg no dia 10.

9.6. Análise da expressão de *interleucina-1 β* em rins craniais de *A. altiparanae* tratados com CsA – qPCR

As curvas de padrões construídas para *interleucina-1 β* e β -actina apresentaram eficiências das amplificações de 109% para *ddx4* e 105%, respectivamente. Os pontos amostrais foram observados dentro dos limites das curvas, com exceção da amostra oriunda do controle sem tratamento por busulfan. A curva padrão obtida para β -actina está mostrada na Figura 22A e 22B e para *interleucina-1 β* na Figura 23A e 23B, sendo retirado o ponto de 8 ng de cDNA para a *interleucina-1 β* .

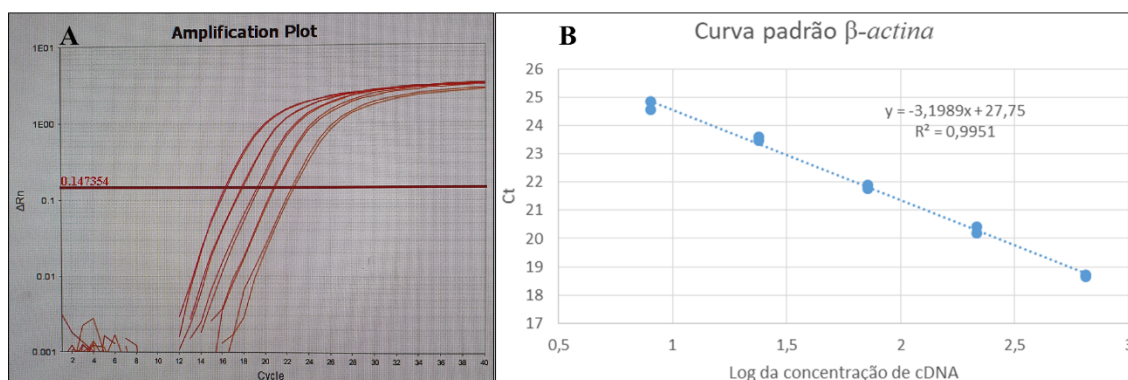


Figura 22. Curva da curva padrão da β -actina. **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.

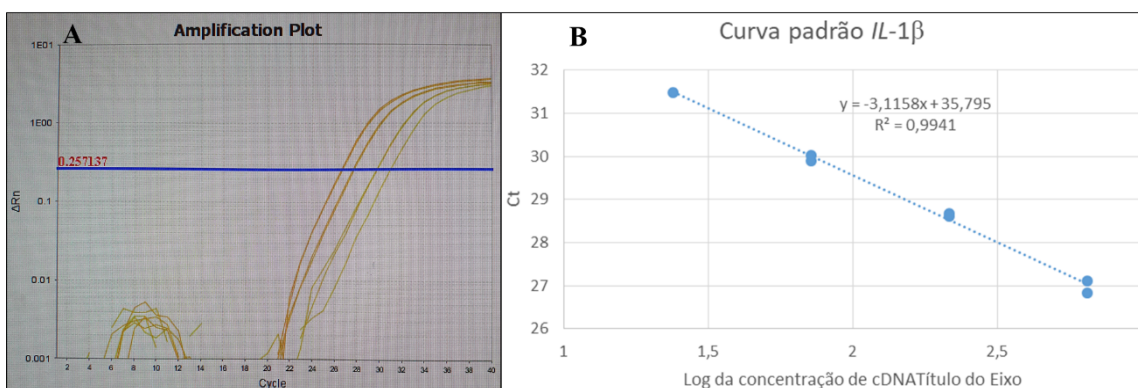


Figura 23. Curva da curva padrão do *interleucina-1β*. **A:** Curva de amplificação. **B:** regressão linear.

As curvas de Melt para β -actina e *interleucina-1β* estão mostradas nas Figuras 24A e 24B, respectivamente. Para a *interleucina-1β*, o ponto de menor concentração de cDNA (8 ng) foi retirado devido à presença de dímeros observada na curva de Melt, obtendo-se um melhor ajuste na regressão linear. Além disso, foi observado que a amostra proveniente do controle sem tratamento por busulfan apresentava Ct acima do estabelecido na curva e a presença de um segundo pico em 76°C na curva de Melt, sugerindo a formação de dímeros de primers. Esta amostra foi retirada das análises de expressão gênica relativa. O controle com tratamento com busulfan também apresentou pico de formação de dímero em amplitude similar ao pico de amplificação (curva de Melt); no entanto, esta amostra ainda foi mantida nas análises para a comparação com as outras amostras e, portanto, sua expressão pode estar superestimada.

Para a análise da expressão relativa da *interleucina-1β*, foi utilizada a amostra controle com emulsão como calibrador na análise da expressão gênica, devido à remoção da amostra controle sem tratamento por busulfan. Os dados obtidos da expressão relativa sugerem que a *interleucina-1β* teve a maior expressão no grupo controle injetado com emulsão (10 dias após a aplicação). O controle tratado com busulfan apresentou a expressão relativa da *interleucina-1β* cerca de 20% menor que o grupo tratado com emulsão. Os grupos tratados com CsA na concentração de 20 e 40 mg/kg apresentaram redução na expressão da *interleucina-1β* em cerca de 60% e 46%, respectivamente, 5 dias após a aplicação do imunossupressor, em relação a amostra calibradora. A redução da expressão da *interleucina-1β* foi ainda mais acentuada 10 dias após a aplicação, sendo obtida a redução na expressão de cerca de 73% (20 mg/kg) e 81% (40 mg/kg). O gráfico da expressão relativa é mostrado na Figura 25.

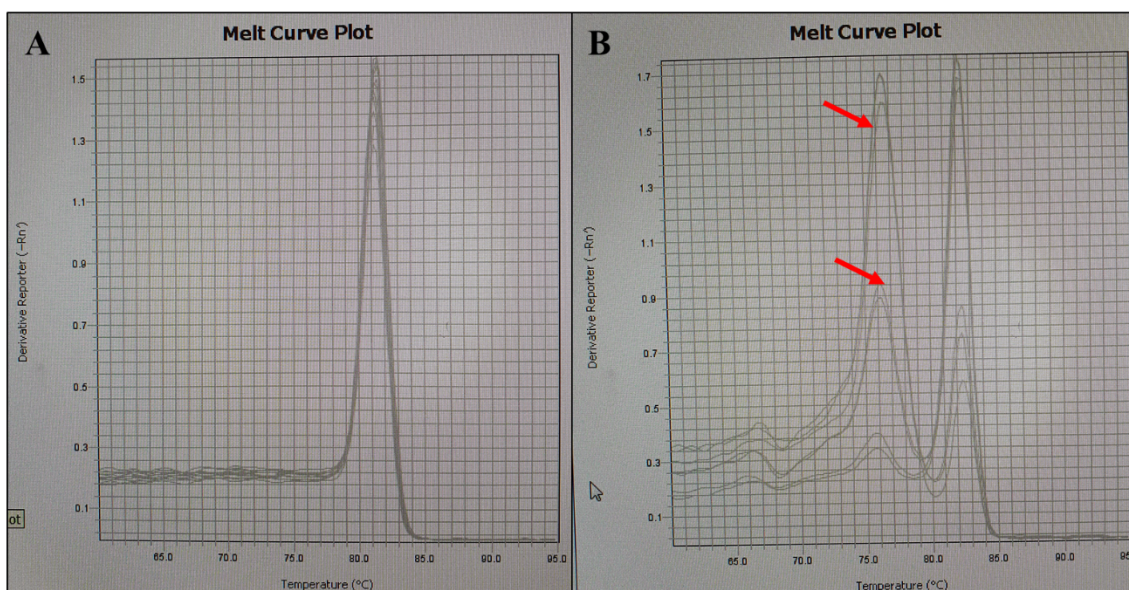


Figura 24. Gráfico da curva de Melt para os pontos das curvas padrões para β -actina (A) e interleucina-1 β (B). No último ponto da curva de Melt, correspondente a 24 ng de cDNA e Ct 31,5 na curva de amplificação, pode ser notado um pico de pequena amplitude na temperatura de 76°C, indicando uma pequena formação de dímero (B). As setas indicam o último ponto da curva retirado da análise e as amostras controles sem e com tratamento de busulfan, também retirados da análise.

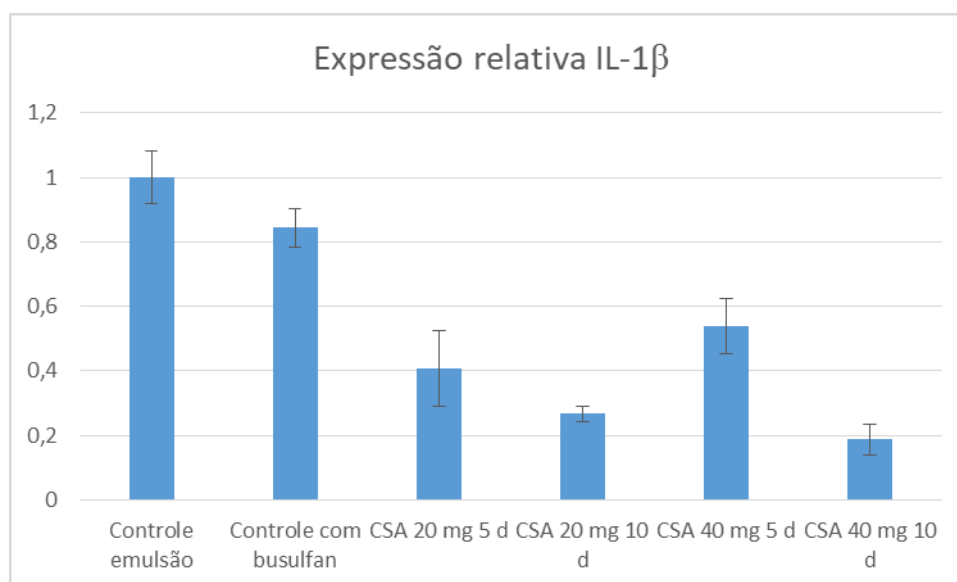


Figura 25. Gráfico da expressão relativa de interleucina-1 β nas amostras: controle tratado com emulsão 10 dias após a aplicação, controle tratado com busulfan, tratamento com CsA a 20 mg/kg cinco dias após a aplicação, tratamento com CsA a 20 mg/kg dez dias após a aplicação, tratamento com CsA a 40 mg/kg cinco dias após a aplicação e tratamento com CsA a 40 mg/kg dez dias após a aplicação.

10. Discussão

10.1. Esterilização química de juvenis triploides de *A. altiparanae*

SIQUEIRA-SILVA et al. (2015) foram pioneiros em verificar a eficácia do antineoplásico busulfan na depleção endógena de *A. altiparanae*. Essa abordagem foi também avaliada em outros peixes não characiformes para sua preparação como receptores, como tilápia do Nilo (LACERDA et al., 2010), *Odontesthes bonariensis* (MAJHI et al., 2009), pejerrey da Patagônia (MAJHI et al., 2009) e zebrafish (NÓBREGA et al., 2010).

Como observado antes do aumento de temperatura nos testículos de *A. altiparanae*, a espermatogênese se transcorre ao longo das paredes dos tubos seminíferos, os quais se anastomosariam e liberariam os espermatozoides no lúmen (COSTA, 2011), se os peixes não fossem triploides e, portanto, incapazes de concluir a gametogênese. Testículos de indivíduos de *A. altiparanae* aclimatados sob altas temperaturas não apresentam sêmen no lúmen e depleção parcial das células germinativas (SIQUEIRA-SILVA et al., 2015) o que foi corroborado pelo presente trabalho, mas a espermatogênese pode retornar em algumas semanas após a diminuição da temperatura. Diante disso, a eliminação mais eficiente das células germinativas desse espaço foi alcançada com administrações de busulfan, que pode dar lugar àquelas do doador, como espermatogônias de *P. mangurus*, para que exclusivamente lhes abrigue durante a espermatogênese.

10.2. Cultura *in vitro* de leucócitos de *A. altiparanae*

CsA é um dos imunossuppressores mais utilizados para evitar a rejeição de transplantes (COHEN et al., 1984). Esse inibidor de proliferação de células T está relacionado à instabilidade genética, não só por reprimir a expressão de genes relacionados à ativação dessas células, como os das *interleucinas* (MATSUDA, 2000; CILIÃO, 2013), mas também por se tornar um agente citotóxico e genotóxico, causando mutagênese indesejadas (CILIÃO, 2013).

A cultura *in vitro* de leucócitos de truta arco-íris com CsA realizada por YOSHINAGA (2018) também apresentou, em resultado semelhante ao presente trabalho, um efeito inibitório significativo sobre as células em relação ao grupo controle

e entre os intervalos de 24 e 48 horas após a cultura, mesmo sob forte estímulo proliferativo (YOSHINAGA, 2018). O conhecimento sobre a imunossupressão *in vitro* em peixes é muito escasso em comparação ao de mamíferos, sendo necessários mais estudos com ênfase nesse grupo. *A. altiparanae* assumido neste trabalho, juntamente com o trabalho de YOSHINAGA (2018), podem ajudar no desenvolvimento de novos modelos de estudo *in vitro* dos efeitos imunossupressores para aprimorar e proporcionar maior viabilidade dos transplantes de células germinativas e enxertias de testículos em peixes.

10.3. Análise histológica dos rins de *A. altiparanae* tratados com CsA

A redução da atividade hematopoiética do rim cranial influenciada por agentes externos foi abordada por WITESKA & BELNIAK (2013) em carpa comum (*Cyprinus carpio*), que mostraram que banhos desinfetantes de verde malaquita, eficazes no tratamento e prevenção de parasitas, infecções por fungos e bactérias (APOLÔNIO, 2015), causam uma leucopenia persistente no sangue, indicando um efeito imunossupressor do agente. Além disso, esses banhos alteram o tecido hematopoiético do rim cranial, diminuindo a frequência dessas células no órgão. Embora essa mudança na estrutura do rim indique que as células migrariam rapidamente para o sangue periférico, foi verificado que o verde malaquita provocou anemia nas carpas (WITESKA & BENIAK, 2013), assim como CsA em *A. altiparanae* no presente estudo. Apesar de não ter sido observada alterações no rim cranial 5 dias após a administração de CsA, no décimo dia após a aplicação, o rim cranial macroscopicamente se apresentava com aspecto mais gelatinoso e se desfazendo facilmente, o que impossibilitou a coleta para as análises histológicas. Este fato pode indicar nefrotoxicidade causada pela droga administrada que pode ser a causa da mortalidade em torno de 40% dos peixes tratados com CsA.

10.4. Esfregaço sanguíneo

VASCONCELOS et al. (2008) registraram anemia hemolítica causada pela administração de CsA em um paciente (VASCONCELOS et al., 2008). Essa condição, pouco documentada na literatura, pode ter acometido os peixes tratados com o imunossupressor neste trabalho. A diminuição no número de células brancas, por outro

lado, é um dos efeitos conhecidos do imunossupressor (AZEER, 2021). A imunossupressão indicada pela diferença nos padrões hematológicos em peixes também foi verificada por ELAZAB et al. (2021), em que houve a diminuição de eritrócitos e células brancas em tilápias do Nilo submetidas à ciclofosfamida, um quimioterápico que é também um agente imunossupressor, e por WITESKA & BENIAK (2013) em carpas comuns submetidas ao banho com verde malaquita, que também demonstrou atividade imunossupressora nos peixes.

No dia 10, os linfócitos do tratamento de 40 mg/kg de CsA diminuíram levemente em proporção, sugerindo que o imunossupressor surtiu efeito parcial. A proporção do grupo controle com emulsão nesse dia se manteve o mesmo, demonstrando que a resposta adaptativa promovida pelos linfócitos contra o veículo de emulsão pode ter se prolongado.

Em relação ao grupo controle sem injeção, do dia 0, o grupo controle com busulfan apresentava mais do dobro de proporção de linfócitos comparado ao controle sem busulfan. Como esse agente tem impacto mínimo para desencadear uma rejeição imunomediada (UCHIDA et al., 2019), a alta temperatura (35°C) sob a qual os peixes esterilizados quimicamente foram submetidos, teria sido a principal fonte de estresse que poderiam a aumentar a produção de glicocorticóides nos animais, que intermediaria a imunomodulação, levando ao aumento na proporção de linfócitos e na mudança de proporções dos leucócitos em geral.

Essa possibilidade poderia ser sustentada pelo trabalho de TSAI E WANG (1997), em que tilápias do Moçambique submetidas à temperatura de 32°C por semanas apresentaram um aumento nos níveis de hormônios do estresse pelo hipotálamo, que inclui os glicocorticóides (TSAI & WANG, 1997). No entanto, essa mudança do parâmetro hematológico entre os dois grupos do dia 0 como causa do aumento de temperatura no tratamento com busulfan contraria estudos anteriores que associam o estresse agudo dos peixes à diminuição no seu número de linfócitos (linfopenia), e ao aumento na proporção de neutrófilos (neutrofilia), aumentando a razão neutrófilo/linfócito (PULSFORD et al., 1994; DAVIS et al., 2008), os quais correspondem de 70 a 80% de todos os leucócitos nos peixes, proporção que este trabalho apresentou de modo geral.

No entanto, o presente trabalho não seguiu a razão neutrófilo/linfócito estabelecida pelas possíveis causas de estresse ao longo do experimento, que também parece não ter sido influenciada pelas administrações de CsA. As proporções dos

eosinófilos, responsáveis pela defesa contra o processo inflamatório e parasitas, os monócitos, contra infecções e bactérias, e basófilos, envolvidos na cura de inflamações, foram levadas pelas mudanças da razão neutrófilo/linfócito (JAIN, 1993; CAMPBELL, 1995; RUPLEY, 1997).

A análise de populações leucocitárias e a imunomodulação, que foi o interesse do item deste trabalho, são interseccionadas por estudos que em sua maioria avaliam os níveis de estresse e imunoestimulantes dos animais envolvidos. JALALI et al. (2009) relacionou parâmetros hematológicos diante de dietas experimentais oferecidas a esturjão beluga, verificando que a proporção de linfócitos aumentou com a dieta suplementada à base de algas imunoestimulantes em relação ao hemograma do grupo controle, com animais não suplementados (JALALI et al., 2009).

Os linfócitos são umas das células mais importantes para modulação da resposta imune, e são considerados pelos ictiólogos o tipo celular mais sensível ao estresse agudo nos peixes (DAVIS et al., 2008; JALALI et al., 2009), que se liga diretamente à fisiologia e à resposta imunológica em torno da homeostase (BONGA, 1997). Essas células produzem anticorpos e também possuem atividade macrofágica (CAMPBELL, 1996). O aumento desse tipo celular observado por JALALI et al. (2009) no grupo controle do esturjão beluga também ocorreu no presente trabalho, principalmente no grupo controle injetado com emulsão no dia 5, indicando que os linfócitos promoveram a defesa do organismo ao veículo de emulsão. Os tratamentos de 20 mg/kg e 40 mg/kg desse dia também apresentaram um aumento de proporção de linfócitos em relação ao dia 10. Uma explicação para esse leve aumento em peixes tratados com CsA pode ser a referência, em humanos, de que a CsA demora várias semanas para que a imunossupressão seja plena (ALIAGA et al., 2019).

10.5. Análise da expressão de *interleucina-1 β* em rins craniais de *A. altiparanae* tratados com CsA

O trabalho com ênfase em imunossupressão de peixes transplantados tratados com CsA foi demonstrado por YOSHINAGA (2018). Ao testar a administração intracelomática com 20 mg/kg e 40 mg/kg do imunossupressor na truta arco-íris enxertada com testículos alogênicos, foi verificado que a dose mais alta promovia a imunossupressão por um tempo maior em relação à de 20 mg/kg, que inibia a expressão de *interleucina-2* por menos tempo. Parte desses resultados coincidiu com o presente

trabalho, visto que as concentrações de 20 e de 40 mg/kg de CsA reprimiram parcialmente a expressão de *interleucina-1 β* nos dias 5 e 10, após a injeção. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que 10 dias após a aplicação da CsA, foi obtida a redução da expressão relativa de *interleucina-1 β* de cerca de 73% (20 mg/kg) e 81% (40 mg/kg). Apesar de não ter sido suprimida totalmente a expressão deste gene, a aplicação destas dosagens de CsA em receptores transplantados pode auxiliar no aumento da eficiência dos transplantes, por reduzir a resposta imunológica ao transplante.

A *interleucina-1 β* foi utilizada como guia molecular para a imunossupressão em peixes sob outros tratamentos imunossupressores, como no caso abordado por ELAZAB et al. (2021), sendo importante para desenvolver um modelo de estudos sobre imunomodulação em peixes. O rim cranial de tilápias do Nilo, tratadas com o agente imunossupressor e quimioterápico ciclofosfamida, apresentou uma redução na expressão de *interleucina-1 β* quando comparado ao grupo não tratado (ELAZAB et al., 2021).

A expressão de citocinas também pode ser modulada por fatores internos dos peixes, como hormônios do estresse, já que os sistemas neuroendócrino e imunológico são intimamente ligados (HARRIS & BIRD, 2000). CASTILLO et al. (2009) relacionaram os níveis de *interleucina-1 β* à modulação de adrenocorticotrópico, adrenalina e cortisol em cultura de células hematopoiéticas do rim cranial de dourada, observando que esses hormônios inibem a expressão desse gene, condição que perdurava com a exposição da cultura a essas substâncias. Este fato, pode conduzir a diferenças de expressão da *interleucina-1 β* nos indivíduos em diferentes grupos experimentais. De acordo com os dados de expressão relativa obtidos neste trabalho, as dosagens de 20 e 40 mg/kg de CsA podem auxiliar a imunossupressão dos receptores até após 10 dias da aplicação do imunossupressor.

11. Conclusão

A combinação das técnicas de manipulação cromossômica e de esterilização química, com administração de busulfan a 50 mg/kg aliada à alta temperatura, foi eficiente para esterilização dos receptores machos juvenis triploides de *A. altiparanae*, garantindo que seu espaço germinativo ficasse livre para abrigar as espermatozônias do

doador, *P. mangurus*. A cultura de leucócitos de *A. altiparanae* tratada com CsA permitiu visualizar os efeitos imunossupressores e citotóxicos dessa substância pela avaliação da viabilidade e concentração celular ao longo do período de exposição das células a CsA. Foi verificado que a maior concentração de CsA utilizada *in vitro* garantiu maior imunossupressão, mesmo diminuindo a concentração e viabilidade dos leucócitos.

A imunossupressão pela administração *in vivo* de CsA nos receptores, verificada pela expressão relativa de *interleucina-1 β* nos rins craniais de *A. Altiparanae*, demonstrou que a concentração de 20 e 40 mg/kg reduziram a expressão relativa de 73% e 81% no décimo dia após a aplicação, respectivamente. Apesar de as taxas de mortalidade em peixes tratados com CsA a 20 e 40 mg/kg terem sido idênticas, a CsA em maior concentração resultou em um comprometimento mais significativo nos rins, macroscopicamente, e no sangue. Este fato sugere que a dosagem de 20 mg/kg pode ser inicialmente utilizada como imunossupressor do transplante em receptores juvenis triploides de *A. altiparanae* tratados com busulfan, mesmo que promova menor repressão da expressão relativa da *interleucina-1 β* . Apesar da aparente eficácia do CsA como imunossupressor, as análises do esfregaço sanguíneo indicaram que o fármaco causa anemia e diminuição significativa no número de leucócitos. No entanto, a CsA não causou alterações estruturais celulares nos rins craniais 5 dias após a administração, tampouco nas gônadas dos peixes imunossuprimidos. Através deste trabalho, foi estabelecido procedimentos de imunossupressão em machos de juvenis triploides de *A. altiparanae* esterilizados com busulfan. Tais procedimentos podem futuramente serem empregados em receptores de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*, podendo evitar a rejeição imunológica.

12. Perspectivas

Os resultados obtidos no presente trabalho forneceram subsídios para a realização de experimentos de avaliação da rejeição do transplante de espermatogônia-tronco de *P. mangurus* em juvenis triploides de *A. altiparanae* esterilizados quimicamente, com e sem a administração do imunossupressor CsA. O uso do imunossupressor na técnica de geração de quimeras germinativas em receptores adultos podem aumentar a eficiência dos transplantes e, conseqüentemente, tornando a produção de quimeras germinativas uma realidade para a sua aplicação tanto na piscicultura como em ações conservacionistas.

13. Referências bibliográficas

- Adamov, N. (2013). Triploidização no lambari (*Astyanax altiparanae*). (Trabalho de conclusão de Curso). PUC, Campinas.
- Adamov, N. S. D. M., Nascimento, N. F. D., Maciel, E. C. S., Pereira-Santos, M., Senhorini, J. A., Calado, L. L., ... & Yasui, G. S. (2017). Triploid induction in the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*, using temperature shock: tools for conservation and aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(5), 741-750.
- Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 26(9), 499-509.
- Agostinho, A.A., et al., 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade* 1(1): 70-78.
- Alexandrino, A. C., Phan, M. T., & Pinheiro, E. F. G. (1985). Caracterização macroscópica das gônadas do Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. *Boletim de Zoologia*, 9(9), 159-175.
- Aliaga, G., Anagusko, C. L. Y., Moraes, P., CUNHA, P. S., CASTRO, F., & YANG, A. C. (2019). Adverse effects of cyclosporine use in patients with severe atopic dermatitis (Late Breaking Abstract). In *Allergy*. WILEY.
- Apolônio, L. F. (2015). Desenvolvimento de método para pré-concentração e determinação de leuco verde malaquita e verde malaquita em águas por análise de imagem digital em superfície adsorvente. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa.
- Araújo, F. G., Nascimento, A. A., Gomes, I. D., Sales, A., & Oliveira, B. A. (2019). Gonadal development and reproductive period of the characin *Astyanax aff. bimaculatus* (Characiformes: Characidae) in a tropical reservoir in southeastern Brazil. *Zoologia (Curitiba)*, 36.
- Arashiro, D. R. (2018). Coleta, reprodução e larvicultura do *Pseudopimelodus mangurus* e desenvolvimento embrionário do *Pimelodus maculatus* e *Pseudopimelodus mangurus* em diferentes temperaturas.
- Azeez, S. H. (2021). Impact of Cyclosporine A on white blood cell counts and some physiological parameters in renal transplanted patients: A case control study. *International Journal of Medical Investigation*, 10(1), 111-119.
- Barton, L. J., LeBlanc, M. G., & Lehmann, R. (2016). Finding their way: themes in

germ cell migration. *Current opinion in cell biology*, 42, 128-137.

Bertolini, R. M., Senhorini, J. A., Nascimento, N. F. D., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Peres, W. A. M., ... & Yasui, G. S. (2018). First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. *Aquaculture Research*, 49(1), 68-74.

Blaxter, J. H. S. (1953). Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172(4391), 1189-1190.

Blankenstein, K. I., Borschewski, A., Labes, R., Paliege, A., Boldt, C., McCormick, J. A., & Mutig, K. (2017). Calcineurin inhibitor cyclosporine A activates renal Na-K-Cl cotransporters via local and systemic mechanisms. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 312(3), F489-F501.

Bonga, S.E. The Stress Response in Fish. *Physiology Review*, v. 77,591-625,1997.
Bontems F, Stein A, Marlow F, Lyautey J, Gupta T, Mullins MC, Dosch R. (2009). Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr Biol*. 19(5):414-22.

Bouwmeester, J., Daly, J., Henley, E.M. *et al.* Conservation of coral reef fishes: a field-hardy method to cryopreserve spermatogonial cells. *Coral Reefs* 41, 855–861 (2022).

Brasil. Portaria nº 148, de 7 de Junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. 08 de junho de 2022, Seção 1, página 74.

Brinster, R. L., & Zimmermann, J. W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11298-11302.

Brinster, C. J., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., Karagenc, L., Brinster, R. L., & Orwig, K. E. (2003). Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biology of reproduction*, 69(2), 412-420.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J. C., & Herráez, M. P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology*, 47(3), 204-213.

Campbell, T. W. (1995) Avian Hematology and Cytology. *Iowa State University Press*, Ames, Iowa.

Campbell, T. W. (1996) Clinical pathology. *Reptile Medicine and Surgery* (ed D. R. Mader), pp 248-257. W. B. Saunders Company.

Campbell, P. D., Heim, A. E., Smith, M. Z., & Marlow, F. L. (2015). Kinesin-1 interacts with Bucky ball to form germ cells and is required to pattern the zebrafish body axis. *Development*, 142(17), 2996-3008.

Campos, M. I. G. et al. (2008). Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. *Implant Dentistry*, v. 14, n. 4, p. 391-398.

Cantú, A. V., & Laird, D. J. (2017). A pilgrim's progress: Seeking meaning in primordial germ cell migration. *Stem cell research*, 24, 181-187.

Carvalho, G. B. (2021). Produção de quimeras germinativas em caraciformes neotropicais para aplicação na aquicultura e conservação. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo.

Carvalho, R.A. and Tejerina-Garro, F.L. (2019). Spatial and temporal trends in freshwater fish research: the case of three neotropical river basins from Goiás State, Central Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 31, e25.

Castillo, J., Teles, M., Mackenzie, S., & Tort, L. (2009). Stress-related hormones modulate cytokine expression in the head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3), 493-499.

Chen, X., Liang, M., & Wang, D. (2018). Progress on the study of the mechanism of busulfan cytotoxicity. *Cytotechnology*, 70(2), 497-502.

Cilião, H. F. (2013). Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de imunossupressores em células humanas in vitro e análise de expressão gênica. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina.

Coelho, G. C. Z. (2021). Characterization and transplantation of primordial germ cells in neotropical fish. Tese (Doutorado em Zoologia). Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho.

Cohen, D. J., Loertscher, R., Rubin, M. F., Tilney, N. L., Carpenter, C. B., & Strom, T. B. (1984). Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Annals of internal medicine*, 101(5), 667-682.

Costa, F. G. (2011). Testículo de *Astyanax altiparanae*. Estudo morfológico, ultraestrutural e imunohistoquímico. Tese de doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo.

Costa, G. M., Lima, A. R., Lima, M. G. D., & Kfoury Jr, J. R. (2012). Histologia e

ultraestrutura do rim e rim cefálico do pacu. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 453-458.

Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional ecology*, 22(5), 760-772.

Dias, M. T., Bozzo, F. R., Sandrin, E. F. S., de Campos Filho, E., & De Moraes, F. R. (2004). Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 26(1), 73-80.

Diogo, M.M., da Silva, C.L., Cabral, J.M.S. (2014). Separation Technologies for Stem Cell Bioprocessing. In *Stem Cells and Cell Therapy*; Al-Rubeai, M., Naciri, M., Eds.; Springer: New York, NY, USA; pp. 157–181. ISBN 978-94-007-7196-3.

Elazab, M. F., Younes, A. M., Gaafar, A. Y., Abu-Bryka, A. Z., & Abdel-Daim, M. M. (2021). Immunosuppressive effect of cyclophosphamide in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), 20784-20793.

Fernandez, J. A., Bubner, E. J., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Wang, T., Cummins, S. F., & Elizur, A. (2015). Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. *General and comparative endocrinology*, 213, 16-23.

Froese, R. and D. Pauly. Editors. (2022). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, (02/2022).

Guimarães-Cruz, R. J., Santos, J. E. D., & Santos, G. B. (2005). Gonadal structure and gametogenesis of *Loricaria lentiginosa* Isbrücker (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22, 556-564.

Hagedorn, M. M., Daly, J. P., Carter, V. L., Cole, K. S., Jaafar, Z., Lager, C. V., & Parenti, L. R. (2018). Cryopreservation of fish spermatogonial cells: the future of natural history collections. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

Hanada, A., & Nagase, H. (1980). Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Reproduction*, 60(1), 247-252. Harris, J., & Bird, D. J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary immunology and immunopathology*, 77(3-4), 163-176.

Hartung, O., Forbes, M. M., Marlow, F. L. (2014). Zebrafish vasa is required for germ-cell differentiation and maintenance. *Molecular Reproduction and Development*,

81(10), 946–961.

Hayashi, M., Sakuma, D., Yoshizaki, G. (2018). Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 85:155–162.

Hickford, D.E., Frankenberg, S., Pask, A. J., Shaw, G., & Renfree, M.B. (2011). DDX4 (VASA) is conserved in germ cell development in marsupials and monotremes. *Biology of Reproduction*, 85(4), 733-743.

Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., Kagawa, N., Kuwayama, M., ... & Takahashi, Y. (2010). Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction*, 139(4), 733-740.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Org.). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: ICMBio. 1232p.

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources - IUCN (2014). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.

Jain, N. C. (1993) Essentials of Veterinary Hematology. *Blackwell Publishing*, Philadelphia.

Jalali, M. A., Ahmadifar, E., Sudagar, M., & Takami, G. A. (2009). Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. *Aquaculture Research*, 40(7), 804-809.

Kaur, G., Mital, P., & Dufour, J. M. (2013). Testisimmune privilege-Assumptions versus facts. *Animal reproduction/Colegio Brasileiro de Reproducao Animal*, 10(1), 3.

Kemenade, B. L., Stolte, E. H., Metz, J. R., & Chadzinska, M. (2009).

Neuroendocrine–immune interactions in teleost fish. *Fish physiology*, 28, 313-364.

Kistler, K. E., Trcek, T., Hurd, T. R., Chen, R., Liang, F. X., Sall, J., ... & Lehmann, R. (2018). Phase transitioned nuclear Oskar promotes cell division of *Drosophila* primordial germ cells. *Elife*, 7, e37949.

Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2007). Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 74(2), 207-213.

Kopranner M, Thisse C, Thisse B, Raz E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.*; 15: 2877-2885.

Lacerda, S. M., Batlouni, S. R., Costa, G. M., Segatelli, T. M., Quirino, B. R., Queiroz, B. M., ... & França, L. R. (2010). A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PloS one*, 5(5), e10740.

Lacerda, S. M. S. N., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P. H. A., Segatelli, T. M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., ... & França, L. R. (2013). Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish physiology and biochemistry*, 39(1), 3-11.

Lee, S., & Yoshizaki, G. (2016). Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology*, 72(2), 165-168.

Lee, S., Katayama, N., & Yoshizaki, G. (2016). Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(3), 1478-1483.

Levy-Pereira, N., Carriero, M. M., Yasui, G. S., Meira, C. M., de Sousa, R. L. M., Maia, A. A. M., ... & Pilarski, F. (2021). Effects of triploid induction on innate immunity and hematology in *Astyanax altiparanae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 116, 12-18.

Linhartová, Z., Rodina, M., Guralp, H., Gazo, I., Saito, T., & Pšenička, M. (2014). Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). *Czech J. Anim. Sci*, 59, 381-390.

Liu, J., Farmer Jr, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66(4), 807-815.

Liu, J. M. W. A., Albers, M. W., Wandless, T. J., Luan, S., Alber, D. G., Belshaw, P. J., ... & Schreiber, S. L. (1992). Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry*, 31(16), 3896-3901.

Lolicato, F., Marino, R., Paronetto, M. P., Pellegrini, M., Dolci, S., Geremia, R., & Grimaldi, P. (2008). Potential role of Nanos3 in maintaining the undifferentiated spermatogonia population. *Developmental biology*, 313(2), 725-738.

López S. L. (2018). Transplante interespecífico de células germinativas-tronco em Siluriformes Neotropicais. Dissertação (Mestrado em zoologia), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

López, L. S. (2022). Transplante interespecífico de espermatogônia tronco de piracanjuba *Brycon orbignyanus*. Tese (Doutorado em zoologia), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Yokota, M., Watanabe, S., & Strüssmann, C. A. (2009). Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. *PloS one*, 4(7), e6132.

Majhi SK, Hattori RS, Rahman SM, Strüssmann CA (2014) Surrogate Production of Eggs and Sperm by Intrapapillary Transplantation of Germ Cells in Cytoablated Adult Fish. *PLoS one* 9(4): e95294.

Matsuda, S., Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine - Review. *Immunopharmacology*. V. 47, p. 119-25.

Melo, R.M.G. (2010). Morfologia comparativa da estrutura gonadal relacionada as estratégias reprodutivas em seis espécies de peixes Siluriformes da bacia do Rio São Francisco. 2010 55f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte: MG.

Melo, F.C.S.A., Godinho, H.P. (2018). A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction (AR)*, 3(3), 380-385.

Nagai T, Yamaha E, Arai K. (2001). Histological Differentiation of Primordial Germ Cells in Zebrafish. *Zool Sci*. 18: 215-223.

Nascimento, N. F., de Siqueira-Silva, D. H., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., Nakaghi, L. S. O., & Yasui, G. S. (2017). Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote*, 25(4), 537-544.

Neto, A. L. C., Costa, M. C., Burdman, E. A., & Yu, L. (2000). Atualização em insuficiência renal aguda: nefrotoxicidade aguda de drogas imunossupressoras. *J Bras Nefrol*, 22(2), 114-20.

Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Veríssimo-Silveira, R., & Senhorini, J. A. (2006). Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 651-659.

Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., & França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish.

Fish physiology and biochemistry, 35(1), 197-206.

Nóbrega, R. H. C.D. Greebe, H. Van de Kant, J. Bogerd, L.R. De França, R.W. (2010). Schulz Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish *PLoS one*, 5, p. e12808

Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2725–2729.

Olguin-Olguin, A., Aalto, A., Maugis, B., Boquet-Pujadas, A., Hoffmann, D., Ermlich, L.,... & Raz, E. (2021). Chemokine-biased robust self-organizing polarization of migrating cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(7), e2018480118.

Patiño, R., & Sullivan, C. V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 57-70.

Piva, L. H. (2016). Produção de peixes estéreis utilizando a hibridação e a manipulação cromossômica. Dissertação de mestrado em Zoologia). UNESP de Botucatu. <http://hdl.handle.net/11449/144512>.

Porras-Gómez, T. J., Villagrán-SantaCruz, M., & Moreno-Mendoza, N. (2021). Biology of primordial germ cells in vertebrates with emphasis in urodeles amphibians. *Molecular Reproduction and Development*, 88(12), 773-792.

Pulsford, A. L. et al. (1994) Effects of acute stress on the immune system of the Dab *Limanda limanda*. *Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 109, 129-139.

Purdy, J. (2018). The Long Environmental Justice Movement. *Ecology Law Quarterly*, 44(4), 809–864.

Ramirez-Merlano, J. A., Medina Robles, V. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2010). Crioconservación espermática en peces, un acercamiento em Siluriformes. *Orinoquia*, 14(1), 59-71.

Rana, K. J. (1995). Cryopreservation of fish spermatozoa. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (pp. 151-165). Humana Press, Totowa, NJ.

Ranzani – Paiva, M. J. T. (1981). Estudos hematológicos em curimatá, (*Prochilodus Scrofa* Steinder, 1981) Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae. 1981. 119f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Instituto de Pesca d Coordenadoria de Recursos Naturais de Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Universidade Federal de São Carlos, São

Carlos.

Raz, E., Reichman-Fried, M. (2006). Attraction rules: germ cell migration in zebrafish. *Current opinion in genetics & development*, 16(4): 355-359.

Ricci, J.M.B., Martinez, E.R.M., Butzge, A.J., Doretto, L.B., Oliveira, M.A., Bombardelli, R.A., Bogerd, J., Nóbrega, R.H. (2018). Characterization of vasa homolog in a neotropical catfish, Jundiá (*Rhamdia quelen*): Molecular cloning and expression analysis during embryonic and larval development. *Gene*. 15(654):116-126.

Riemer, S., Bontems, F. Krishnakumar, P. Gömann, J. Dosch, R. (2015). A functional Bucky ball-GFP transgene visualizes germ plasm in living zebrafish, *Gene Expression Patterns*. Pages 44-52

Robles, V., Riesco, M. F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D. G., Cabrita, E., & Herraes, P. (2017). Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: biotechnological applications. *Aquaculture*, 472, 4-20.

Rupley, A. E. (1997). Manual of Avian Practice. *W. B. Saunders Company*.

Şahinöz E., Aral F., Doğu Z., Koyuncu İ., Yüksekdağ Ö. (2020). Cryopreservation of Mesopotamian catfish (*Silurus triostegus* H., 1843) spermatozoa: Effects of diluents and osmotic pressure on spermatozoa DNA damage, rate and duration of motility. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(5), 2293-2307.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., & Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biology of reproduction*, 78(1), 159-166.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., & Yamaha, E. (2010). Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *International Journal of Developmental Biology*, 54(10), 1481-1486.

Santos, H. B. D., Sampaio, E. V., Arantes, F. P., & Sato, Y. (2013). Induced spawning and reproductive variables of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 11, 607-614.

Shiguemoto GF, Arashiro DR, Levy-Pereira N, Santos SCA, Senhorini JA, Monzani PS, Yasui GS. Domestication strategies for the endangered catfish species *Pseudopimelodus mangurus* Valenciennes, 1835 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Braz J Biol.*, 81(2):301-308, 2021.

Shiguemoto, G.F., Coelho, G.C.Z., López, L.S., Pessoa, G.P., dos Santos, S.C.A., Senhorini, J.A., Monzani, P.S., Yasui, G.S. (2022). Primordial germ cell identification

and traceability during the initial development of the Siluriformes fish *Pseudopimelodus mangurus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 48(5):1137-1153.

Silva, M.A., Costa, G.M., Lacerda, S.M., Brandão-Dias, P.F., Kalapothakis, E., Silva Júnior, A.F., Alvarenga, E.R., França, L.R. (2016). Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *Gen Comp Endocrinol.*, 230-231:48-56.

Siqueira Silva, D. H. et al. (2015). The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. *Theriogenology*, v. 84, n. 6, p. 1033-1042.

Skugor, Adrijana & Slanchev, Krasimir & Torgersen, Jacob & Tveiten, Helge & Andersen, Oivind. (2013). Conserved Mechanisms for Germ Cell-Specific Localization of nanos3 Transcripts in Teleost Species with Aquaculture Significance. *Marine biotechnology* (New York, N.Y.).

Škugor, A., Tveiten, H., Johnsen, H., & Andersen, Ø. (2016). Multiplicity of Buc copies in Atlantic salmon contrasts with loss of the germ cell determinant in primates, rodents and axolotl. *BMC evolutionary biology*, 16(1), 1-12.

Suzuki, H., Tsuda, M., Kiso, M., & Saga, Y. (2008). Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and-independent apoptotic pathways. *Developmental biology*, 318(1), 133-142.

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Saga Y. (2010). NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Takeda, Y., Mishima, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., & Inoue, K. (2009). DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly (A) tail length in zebrafish. *PloS one*, 4(10), e7513.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., & Takeuchi, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of reproduction*, 69(4), 1142-1149.

Tsai, C. L., & Wang, L. H. (1997). Effects of thermal acclimation on the neurotransmitters, serotonin and norepinephrine in the discrete brain of male and female tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Neuroscience letters*, 233(2-3), 77-80.

Uchida, N., Nassehi, T., Drysdale, C. M., Gamer, J., Yapundich, M., Bonifacino, A. C., ... & Tisdale, J. F. (2019). Busulfan combined with immunosuppression allows efficient engraftment of gene-modified cells in a rhesus macaque model. *Molecular*

Therapy, 27(9), 1586-1596.

Vasconcelos, R.S., Zanis Neto, J., Parolin, M., Coelho, J., Müller, P.G. (2008). Anemia hemolítica microangiopática induzida por tacrolimus e ciclosporina A. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30:505-506.

Vasconcelos, A.C.N., Streit, D.P. Jr, Octavera, A., Miwa, M., Kabeya, N., Freitas Garcia, R.R., Rotili, D.A., Yoshizaki, G. (2019). Isolation and characterization of a germ cell marker in teleost fish *Colossoma macropomum*. *Gene*. 30(683):54-60.

Wakahara, M. (1990). Germ plasm: Its role in species continuity on the earth and in space. In M. Asashima & G.M. Malacinski (Eds.), *Fundamentals in space biology*, pp. 139-151. Japanese Sciences Press.

Witeska, M., Kondera, E., Belniak, N. (2013). Hematological and hematopoietic changes induced by formaldehyde and malachite green in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Zoology and Ecology*, 23(3):245-251.

Wong, T. T., Saito, T., Crodian, J., Collodi, P. (2011). Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biology of reproduction*, 84(6):1190-1197.

Wowk, B. (2007). How cryoprotectants work. *Cryonics*, 28(3), 3-7.

Xie X, Nóbrega R, Pšenička M. (2020). Spermatogonial Stem Cells in Fish: Characterization, Isolation, Enrichment, and Recent Advances of In Vitro Culture Systems. *Biomolecules*, 10(4):644.

Xu, D., Yoshino, T., de Bello Cioffi, M., Yoshikawa, H., Ino, Y., Yazawa, R., & Takeuchi, Y. (2020). Production of donor-derived eggs after ovarian germ cell transplantation into the gonads of adult, germ cell-less, triploid hybrid fish. *Biology of Reproduction*, 103(6):1289-1299.

Yamaji, M., Jishage, M., Meyer, C., Suryawanshi, H., Der, E., Yamaji, M., ... & Tuschl, T. (2017). DND1 maintains germline stem cells via recruitment of the CCR4–NOT complex to target mRNAs. *Nature*, 543(7646), 568-572.

Ye, H., Li, C. J., Yue, H. M., Du, H., Yang, X. G., Yoshino, T., ... & Wei, Q. W. (2017). Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. *Theriogenology*, 94, 37-47.

Yön, Nazan Deniz, & Akbulut, Cansu. (2015). Identification of Primordial Germ Cells: Cytological, Histological and Immunohistochemical Aspects. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 222-228.

Yoshinaga, Túlio Teruo. (2018). Efeitos de imunossupressores sobre o sistema

imunológico em transplantes de células germinativas em trutas arco-íris. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo.

Yoshinaga, T. T., Júnior, J. R. K., Butzge, A. J., Olio, R. L., Hernandez-Blazquez, F. J., Carreira, A. C. O., ... & Hattori, R. S. (2021). Testicular subcutaneous allografting followed by immunosuppressive treatment promotes maintenance of spermatogonial cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 112, 108-115.

Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., & Takeuchi, T. (2000). Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 55(4), 364-371.

Zhang, J., Tian, Y., Li, Z., Wu, Y., Li, Z., Cheng, M., ... & Zhai, J. (2020). Optimization of vitrification factors for embryo cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*). *Theriogenology*, 142, 390-399.

Zhou, L., Wang, X., Liu, Q., Yang, J., Xu, S., Wu, Z., ... & Li, J. (2021). Successful spermatogonial stem cells transplantation within pleuronectiformes: first breakthrough at inter-family level in marine fish. *International journal of biological sciences*, 17(15), 4426.

Zohni K., Zhang X., Tan S.L., Chan P. and Nagano M.C. (2012). The efficiency of male fertility restoration is dependent on the kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Hum. Reprod.* 27, 44-53.