

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**TRANSPLANTE SINGÊNICO E XENOGÊNICO DE ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO  
EM TILÁPIAS-NILÓTICAS (*Oreochromis niloticus*) ADULTAS.**

DOUTORANDA: Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Renato de França

BELO HORIZONTE

2010

SAMYRA MARIA DOS SANTOS NASSIF LACERDA

TRANSPLANTE SINGÊNICO E XENOGÊNICO DE ESPERMATOGÔNIAS-TRONCO EM  
TILÁPIAS-NILÓTICAS (*Oreochromis niloticus*) ADULTAS.

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular da Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular.  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França.

BELO HORIZONTE

2010

Às pessoas que amo e estimo.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma contribuíram, para realização deste trabalho:

Ao professor Dr. Luiz Renato de França por toda a confiança depositada, pelo exemplo de competência e excelência profissional. Obrigada pela oportunidade de enriquecer meu conhecimento;

Aos meus pais Levindo e Terezinha e irmãos Sumaya e Samuel pelo constante incentivo e confiança.

Ao Guilherme Costa, sempre presente, pelo carinho e apoio que me conforta e fortalece. Obrigada pelo companheirismo, alegria e por tornar o ambiente de trabalho tão agradável.

À professora Tânia Mara Segatelli pela amizade, ajuda e aconselhamentos que foram de grande valia na minha formação pessoal e científica;

Ao Sergio Ricardo Batlouni pela grande ajuda durante a execução do trabalho;

Ao professor Evanguedes Kalapothakis pelo grande auxílio e opiniões e a seus alunos, sem os quais este trabalho teria encontrado dificuldades maiores para sua realização;

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular, pelos constantes momentos de alegria e aprendizado;

Aos demais colegas do curso de Pós-graduação em Biologia Celular;

Ao Adriano, Mara e Rachel, técnicos do Laboratório de Biologia Celular;

À secretária do curso de Pós-Graduação, Sibebe das Graças Abreu.

Às fundações financiadoras CNPq, CAPES e FAPEMIG;

Ao corpo administrativo do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

A todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

Esta tese foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Renato de França e com o auxílio financeiro das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1. Peixes Teleósteos.....	1
1.2. A tilápia-nilótica ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	2
1.3. Estrutura do testículo em teleósteos.....	3
1.4. A Espermatogênese.....	5
1.4.1. Espermatogênese em mamíferos.....	6
1.4.2. Espermatogênese em teleósteos.....	8
1.5. Transplante de espermatogônias.....	13
1.6. Transplante de espermatogônias em peixes.....	21
1.7. Perspectivas do transplante de espermatogônias.....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1. Animais.....	29
3.2. Depleção da espermatogênese endógena dos animais receptores.....	29
3.3. Obtenção das células germinativas dos animais doadores.....	30
3.3.1. Dissociação enzimática dos testículos de tilápias, tucunarés e rãs.....	30
3.3.2. Dissociação enzimática dos testículos de ratos.....	31
3.3.3. Separação por gradiente de Percoll, plaqueamento diferencial por adesão e seleção das células germinativas.....	32
3.4. Marcação das células germinativas dos doadores.....	33
3.5. Transplante de células germinativas e análise dos testículos transplantados.....	35
3.5.1. Transplante singênico.....	35
3.5.2. Transplante xenogênico.....	36
Tucunaré para Tilápia-nilótica.....	36
Rã-touro para Tilápia-nilótica.....	36
Rato para Tilápia nilótica.....	37
3.5.3. Processamento das amostras para análise em microscopia de fluorescência e convencional.....	37
3.6. Análise de DNA microsatélite de tilápias-nilóticas.....	38
3.6.1. Extração de DNA.....	39
3.6.2. PCR e eletroforese.....	39
3.7. Criopreservação de espermatogônias de tilápia-nilótica.....	40
3.8. Imunohistoquímica.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>

4.1. Seleção das células germinativas para o transplante.....	44
4.2. Marcação das células germinativas dos doadores.....	44
4.3. Injeção de espermatogônias dos doadores nos testículos de tilápias tratadas com busulfan.....	45
4.3. Transplante singênico: desenvolvimento das células germinativas transplantadas.....	46
4.3.1. Tilápia - Tilápia.....	46
4.3.2- Tilápia (linhagem Ceará) - Tilápia (linhagem Chitralada).....	47
4.4. Criopreservação de espermatogônias de tilápia-nilótica.....	48
4.5. Imunohistoquímica para o receptor Notch-1 nos testículos de tilápias-nilóticas.....	49
4.6. Transplante xenogênico.....	49
4.6.1. Tucunaré - Tilápia.....	49
4.6.2. Rã-touro - Tilápia.....	49
4.6.3- Rato- Tilápia.....	50
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6. FIGURAS .....</b>	<b>60</b>
<b>7. TABELAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>9. ANEXO: Trabalho publicado.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>FIGURA 1.</b> <i>Plaqueamento seletivo por adesão de células testiculares de tilápia.....</i>	60
<b>FIGURA 2.</b> <i>Marcação das células germinativas de tilápias-nilóticas.....</i>	61
<b>FIGURA 3.</b> <i>Injeção das células germinativas do doador no testículo de tilápias adultas.....</i>	62
<b>FIGURA 4.</b> <i>Transplante singênico (tilápia-tilápia).....</i>	63
<b>FIGURA 5.</b> <i>Análise em microscopia confocal de testículos de tilápias receptoras cinco semanas após o transplante.....</i>	64
<b>FIGURA 6.</b> <i>Análise de paternidade.....</i>	64
<b>FIGURA 7.</b> <i>Taxa de sobrevivência de espermatogônias isoladas de tilápia-nilóticas após o congelamento.....</i>	65
<b>FIGURA 8.</b> <i>Transplante singênico de espermatogônias criopreservadas.....</i>	66
<b>FIGURA 9.</b> <i>Deteção através de imunohistoquímica do receptor Notch-1 nos testículos de tilápias-nilóticas.....</i>	67
<b>FIGURA 10.</b> <i>Transplante xenogênico (tucunaré-tilápia).....</i>	68
<b>FIGURA 11.</b> <i>Transplante xenogênico (rã-tilápia).....</i>	69
<b>FIGURA 12.</b> <i>Transplante xenogênico (rato-tilápia).....</i>	70
<b>FIGURA 13.</b> <i>Transplante xenogênico (rato GFP - tilápia).....</i>	71
<b>FIGURA 14.</b> <i>Principais etapas do transplantes de células germinativas utilizando tilápias sexualmente maduras como receptor.....</i>	72
<b>TABELA 1.</b> <i>Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante singênico de espermatogônias.....</i>	74
<b>TABELA 2.</b> <i>Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante singênico de espermatogônias criopreservadas.....</i>	74
<b>TABELA 3.</b> <i>Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante xenogênico de espermatogônias de rãs-touro (Lithobates catesbeianus).....</i>	75
<b>TABELA 4.</b> <i>Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante xenogênico de espermatogônias de ratos Wistar.....</i>	75



## RESUMO

O transplante de células germinativas consiste na remoção de espermatogônias-tronco do testículo de um animal doador e a transferência das mesmas para o testículo de um animal receptor, sem espermatogênese endógena, onde estas células irão se desenvolver e formar espermatozóides maduros com características genéticas do doador. Esta técnica apresenta-se como única abordagem funcional disponível para se investigar a biologia das espermatogônias tronco em mamíferos, e mesmo em outros vertebrados. Apesar de já ser bem caracterizado em mamíferos, este é o primeiro relato de sucesso do transplante não-cirúrgico de espermatogônias-tronco diretamente no testículo de peixes adultos. Utilizando-se a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental, nove semanas após o transplante demonstramos a produção de espermatozóides dos doadores nos testículos receptores que tiveram a espermatogênese endógena depletada através do tratamento com a droga quimioterápica busulfan. Além disso, utilizando duas linhagens diferentes de tilápias, verificamos através de análises de DNA microsatélite, a geração de progênie com indivíduos apresentando o genótipo dos animais doadores, que pertenciam a uma linhagem de tilápia vermelha (variedade Ceará). Do mesmo modo, após o transplante, espermatogônias criopreservadas de tilápias foram capazes de proliferar e se diferenciar em espermatozóides nos testículos dos peixes receptores. Comparados com outros métodos já descritos na literatura utilizando larvas e embriões receptores, estes resultados indicam que o transplante de espermatogônias utilizando peixes sexualmente maduros pode facilitar e reduzir consideravelmente o tempo necessário para obtenção de gametas viáveis e prole com o genótipo do doador. A viabilidade de machos adultos de tilápia como modelo receptor para o transplante xenogênico de células germinativas também foi demonstrada utilizando-se espermatogônias tronco provenientes de outra espécie de teleósteo (tucunaré, *Cichla monoculus*), bem como de espécies de vertebrados pertencentes a diferentes classes (rã-touro, *Lithobates catesbeianus*; rato, *Rattus norvegicus*). Neste tipo de transplante, as espermatogônias exógenas foram capazes de colonizar e proliferar nos testículos de tilápia, demonstrando assim a plasticidade do ambiente dos túbulos seminíferos nesta espécie de teleósteo. Dessa forma, uma metodologia inédita e viável de transplante de espermatogônias foi estabelecida, propiciando assim um cenário totalmente novo e bastante promissor para a investigação da biologia das espermatogônias-tronco e da função testicular de teleósteos e outros vertebrados, além de apresentar potenciais aplicações nas áreas de biotecnologia, conservação e produção em aquicultura.

**Palavras-chaves:** Transplante de espermatogônias-tronco, biotecnologia, criopreservação, tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*), espermatogênese, vertebrados.

**ABSTRACT**

Germ cell transplantation consists in the removal of spermatogonial stem cells from the testis of a donor animal and the transferring of them into the testis of a recipient animal, where these cells will develop to form mature spermatozoa presenting donor genetic characteristics. This technique is the only available approach to functionally investigate the spermatogonial stem cell biology in mammals and even in other vertebrates. Although is well characterized in mammals, this is the first successful report of a non-surgical methodology for spermatogonial transplantation directly into the testes of adult fish. Using the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as model, nine weeks after transplantation we demonstrated the production of donor spermatozoa in the recipient testis, in which endogenous spermatogenesis had been depleted with the cytostatic drug busulfan. In addition, through microsatellite DNA analysis, we verify the generation of progeny with individuals presenting the genotype of donor animals, which belonged to a different strain of Nile tilapia (Red tilapia). Similarly, after transplantation, cryopreserved tilapia spermatogonia were able to proliferate and differentiate into spermatozoa in the embryos and larvae, these results indicate that spermatogonial transplantation in sexually mature fish may facilitate and reduce considerably the time needed to obtain viable gametes and offspring with donor genotype. The suitability of adult males of tilapia as a recipient model for xenogenic transplantation was also demonstrated using spermatogonial stem cell derived from other teleost species (tucunaré, *Cichla monoculus*) and vertebrate species belonging to different classes (bullfrog, *Lithobates catesbeianus*; rat, *Rattus norvegicus*). In this type of transplantation, the exogen spermatogonia were able to colonize and proliferate in the testes of tilapia, thus demonstrating the plasticity of the seminiferous tubules environment in this species of teleost. Therefore, a new and viable methodology of spermatogonial transplantation was established, providing a totally new and quite promising scenario for investigation of the spermatogonial stem cell biology and testicular function in teleosts and other vertebrates, also presenting potential applications in biotechnology, conservation and production in aquaculture.

**Keywords:** spermatogonial stem cell transplantation, biotechnology, cryopreservation, tilapia (*Oreochromis niloticus*), spermatogenesis, vertebrates.

## **1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1- PEIXES TELEÓSTEOS**

Os peixes ósseos verdadeiros, os Osteichthyes, surgiram no período Siluriano Superior a aproximadamente 430 milhões de anos e dividem-se em quatro subclasses: Dipnoi, Crossopterygii, Brachyopterygii e Actinopterygii. Essa última está composta pelos Chondrostei, Holostei e Teleostei. Os teleósteos (infraclasse Teleostei) correspondem a cerca de 96% de todos os peixes existentes, incluem mais de vinte mil espécies em 4.064 gêneros, 426 famílias, 38 ordens, e são conhecidos como “peixes ósseos modernos” (Nelson 1994). Patterson (1968) propôs que os teleósteos formam um grupo natural e monofilético. Todos os grupos incluídos nesta infraclasse possuem esqueleto caudal, importante na evolução dos padrões de locomoção do grupo, e modificações na musculatura da mandíbula que os distinguem dos outros Actinopterygii. Os representantes do táxon Teleostei, por sua vez, se dividem em quatro grupos: Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Clupeomorpha e Euteleostei. Animais exclusivamente dulciaquícolas se restringem apenas a subdivisão Osteoglossomorpha, os três grupos restantes apresentam exemplares em ambientes marinhos e de água doce (Patterson & Rosen, 1977; Nelson, 1994).

Os teleósteos, assim como referido acima, constituem o maior e provavelmente mais diversificado grupo de vertebrados. O habitat ocupado pelos teleósteos é extremamente diversificado sugerindo que, ao longo de sua história evolutiva, esses peixes desenvolveram um eficiente diálogo adaptativo com o meio ambiente (Billard, 1986; Nelson, 1994). Desta forma, foram capazes de colonizar e de se reproduzirem numa variedade muito grande de microambientes graças a uma complexidade de estratégias reprodutivas como por exemplo, a liberação dos gametas para fertilização externa; o desenvolvimento de órgãos especializados para fertilização interna; os variados tipos de comportamento e de cuidado com a prole; e a migração reprodutiva, seja nas formas de piracema ou naquelas acompanhadas por grandes alterações osmóticas (Hoar, 1969; Borges Filho, 1987; Le Gac & Loir, 1999; Sato et al., 2003).

## **1.2- A TILÁPIA-NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*)**

A tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) é um teleósteo pertencente à ordem Perciformes, família Cichlidae e à sub-família Tilapiinae. Embora cerca de 70 espécies de ciclídeos recebam a denominação de tilápia, somente *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis aureus*, *Tilapia rendalli* e seus híbridos apresentam importância para aquicultura mundial (Stickney, 1997). *Oreochromis niloticus* destaca-se entre as demais por exibir características de interesse zootécnico. O cultivo desta espécie ocorre há mais de 3000 anos no Egito e, atualmente, está espalhado por quase todos os países do mundo, constituindo a segunda espécie de peixe de água doce mais produzida no mundo por apresentar uma carne de excelente qualidade e de boa aceitação pelo mercado consumidor (Torrans, 1998; FAO, 2007); o que faz da tilápia-nilótica a espécie mais promissora para a aquicultura do século XXI (Fitzsimmons, 2000). A produção mundial de tilápia tem crescido nas últimas décadas, subindo de 0,83 milhões de toneladas em 1990, para 1,6 milhões de toneladas em 1999 e mais de 2,5 milhões de toneladas em 2005. Estima-se ainda que a produção total de tilápias em 2010 poderá alcançar 3,5 milhões de toneladas (FAO, 2007). Particularmente no Brasil, onde foi introduzida a partir de 1971, a tilápia-nilótica é a espécie de água doce mais cultivada (Mainardes-Pinto et al., 1995; Lovshin & Cyrino, 1998). Provavelmente, este cultivo deve-se às condições altamente favoráveis que o Brasil oferece, levando o Ministério da Agricultura a indicar esta espécie como o principal peixe para o estabelecimento da cadeia produtiva de pescado de água doce. Desta forma, financiamentos têm sido alocados para pequenos produtores que se interessam em cultivar tilápias. Além disso, pólos de cultivo e processamento de tilápia se multiplicam no Brasil, impulsionados principalmente pelo interesse dos consumidores dos Estados Unidos e da Europa (FAO, 2007).

Do ponto de vista biológico, a tilápia-nilótica é onívora alimentando-se de algas, fitoplâncton, zooplâncton, ovos e larvas de peixes e detritos. Esta característica faz com que a tilápia cresça rapidamente com a utilização de níveis muito baixos de proteínas e tolere altos níveis de carboidratos na dieta (Stickney, 2000). Tilápias-nilóticas se caracterizam ainda por apresentarem cuidado parental bucal desenvolvido pela fêmea (Trewavas, 1983). Apresentam tamanho conveniente e tolerância a baixos teores de oxigênio dissolvido e a

grandes variações nas condições ambientais (Beamish, 1970; Silva, 1987). Além destes aspectos bastante positivos, esta espécie atinge a maturidade sexual precocemente (entre 4 e 5 meses de idade), sua desova ocorre de 2 em 2 meses se a temperatura da água permanecer acima de 24°C, e suas larvas apresentam alta viabilidade. A conjunção das qualidades altamente positivas anteriormente mencionadas faz com que as tilápias-nilóticas se apresentem também como excelente modelo experimental para se investigar a biologia reprodutiva de peixes teleósteos com alto potencial produtivo (Stickney, 2000).

### **1.3- ESTRUTURA DO TESTÍCULO EM TELEÓSTEOS**

Os testículos dos peixes estão localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestivo, ventralmente ao mesonefro e ventro-lateralmente ao longo da bexiga gasosa, encontrando-se presos à parede abdominal dorsal pelo mesórquio. Macroscopicamente, os testículos da maioria dos teleósteos estudados são órgãos pares, podendo estar parcial ou totalmente fundidos entre si, apresentam usualmente tamanho similar entre o direito e o esquerdo e são freqüentemente alongados, embora existam outras formas como lobulados e foliáceos (Le Gac & Loir, 1999).

Particularmente na tilápia-nilótica os testículos são pares e alongados, de superfície lisa e apresentam tamanho semelhante entre o direito e o esquerdo. Cada testículo apresenta uma extremidade cranial afilada, uma parte média de forma triangular e uma porção caudal (distal) que se afila gradualmente até unir-se à do outro testículo (Silva & Godinho, 1983). Externamente, este órgão é revestido por delicada cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, da qual partem septos fibrosos em sentido radial que percorrem o interior do órgão em direção ao lado oposto, dividindo o testículo em lóbulos incompletos (Silva, 1987). Esses lóbulos são preenchidos pelos túbulos seminíferos que apresentam a mesma disposição radial e terminam em um fundo cego (Loir et al., 1995). Os túbulos seminíferos convergem para um sistema de ductos eferentes, que por sua vez desembocam no ducto espermático principal, que se unirá ao ducto espermático principal do outro testículo, formando um ducto único que desemboca na papila urogenital (Silva, 1987; Matta, 2000).

A organização estrutural básica do testículo é comum a todos os peixes e aos demais vertebrados (Schulz et al., 2010). Este órgão exerce as funções de produção de gametas

(espermatogênica) e endócrina (androgênica), possuindo para isto dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial e o compartimento tubular ou germinativo (Koulisch et al., 2002). No compartimento intersticial estão situados vasos sanguíneos/linfáticos, fibras nervosas, células e fibras do tecido conjuntivo, além das células de Leydig que possuem função esteroidogênica. A produção de andrógenos (testosterona e principalmente 11-cetotestosterona) é importante para a diferenciação sexual, o desenvolvimento das características sexuais secundárias e comportamento sexual, e para a regulação da espermatogênese (Weltzien et al., 2004, Schulz et al., 2010). O compartimento tubular é constituído pela túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células peritubulares mióides e membrana basal. No epitélio seminífero são encontradas dois grupos distintos de células, as células de Sertoli (células somáticas) e as células germinativas que irão formar os espermatozoides após passarem por processo bastante complexo e altamente organizado – a espermatogênese (Billard, 1990; Koulisch et al., 2002). As células somáticas são os elementos chave para a função normal do testículo (Le Gac & Loir, 1999), sendo a célula de Sertoli considerada como a mais importante para o desenvolvimento das células germinativas (Russell & Griswold, 1993; Schulz et al., 2010).

De acordo com o arranjo do compartimento germinativo, os testículos de peixes ósseos, de maneira geral, podem ser classificados em duas categorias: testículo tubular anastomosado e testículo lobular (Parenti & Grier, 2004). O testículo tubular anastomosado possui compartimento germinativo formado por alças e túbulos ramificados que se interconectam da periferia até o ducto testicular principal. Esse tipo de testículo é encontrado em de grupos de teleósteos menos derivados (“grupos basais” segundo Grier, 1993) como, por exemplo nos Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes e Salmoniformes. No testículo lobular, o compartimento germinativo apresenta formato digitiforme terminando em fundo cego na periferia dorso-lateral do testículo. Esse tipo de testículo é encontrado em teleósteos derivados e essa característica é, possivelmente, uma sinapomorfia dos Neoteleósteos (subdivisão de Euteleostei). Quanto à distribuição de espermatogônias, os testículos lobulares podem ainda ser classificados em restritos e irrestritos. Nos testículos lobulares restritos (distribuição espermatogonial restrita), as regiões distais do compartimento germinativo, próximas a túnica albugínea, são ocupadas por espermatogônias indiferenciadas circundadas por células de Sertoli mais imaturas. Esse

tipo de testículo é característico de teleósteos mais derivados como das ordens Atheriniformes, Cyprinodontiformes e Beloniformes (Parenti & Grier, 2004). Os testículos lobulares irrestritos (distribuição espermatogonial irrestrita) apresentam espermatogônias distribuídas ao longo do compartimento germinativo por toda extensão do órgão. Esse último padrão de distribuição espermatogonial é considerado mais primitivo, sendo encontrado em grupos taxonômicos menos relacionados como em Percopsiformes, Ophidiiformes e Perciformes (Parenti & Grier, 2004; Nóbrega, 2006; Schulz et al., 2010).

Conforme mencionado, em tilápias-nilóticas os túbulos seminíferos apresentam arranjo radial, onde cada túbulo tem a extremidade distal em fundo cego, voltada para a periferia do testículo, e a extremidade proximal, terminando nos ductos eferentes localizados ventralmente (Silva, 1987). De acordo com essas características, Parenti & Grier (2004) qualificaram os testículos das tilápias como lobulares irrestritos. Entretanto, um padrão de distribuição espermatogonial intermediário entre restrito e irrestrito parece ocorrer no testículo desta espécie. Assim, em tilápias-nilóticas as espermatogônias indiferenciadas apresentam localização preferencial, mas não exclusiva no compartimento tubular. Apesar de serem observadas ao longo de todo o túbulo seminífero, células de Sertoli imaturas e espermatogônias indiferenciadas concentram-se na extremidade distal dos túbulos seminíferos, próximo à túnica albugínea (Silva, 1987; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005). Esse padrão de distribuição espermatogonial também já foi relatado em Pleuronectiformes, *Solea senegalensis* (Garcia-Lopes et al., 2005) e Gadiformes, *Gadus morhua* (Almeida et al., 2008).

#### **1.4- A ESPERMATOGÊNESE**

O processo espermatogênico é um evento cíclico, altamente organizado e coordenado, no qual as espermatogônias diplóides se dividem e se diferenciam para formar espermatozóides maduros. Baseado em características morfofuncionais, este processo pode ser dividido em três fases: (a) *fase proliferativa ou espermatogonial*, caracterizada pela auto-renovação das espermatogônias-tronco e proliferação espermatogonial, com a divisão mitótica das espermatogônias comprometidas com a espermatogênese; (b) *fase meiótica ou espermatocitária*, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado, fase esta importante para a diversidade genética entre membros de uma espécie; e (c) *fase de*

*diferenciação ou espermiogênica*, em que as espermatídes passam por transformações morfogênicas, que culminam na formação dos espermatozoides (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994; Eddy, 1999). Após essas etapas ocorre ainda a espermição, na qual os espermatozoides são liberados para o lúmen do túbulo seminífero, e a maturação espermiática, onde o gameta, morfológicamente preparado, torna-se funcionalmente apto para fertilizar o ovócito (Schulz & Miura, 2002; Miura & Miura, 2003; Schulz, 2003; Weltzien et al., 2004).

A base do processo espermatogênico é a espermatogônia-tronco, a qual, por definição funcional, tem potencial para se auto-renovar e também para originar espermatogônias diferenciadas comprometidas com a formação dos espermatozoides (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij, 2001 e 2006a,b; Ehmcke et al., 2006a; Yan, 2006). Assim, o balanço adequado entre a auto-renovação e a diferenciação das espermatogônias-tronco é essencial para garantir a continuidade e a homeostase do processo espermatogênico durante toda vida reprodutiva do macho.

#### **1.4.1 - Espermatogênese em Mamíferos**

Pelo fato da espermatogênese em mamíferos ser melhor investigada do que em peixes, fazemos aqui, inicialmente, uma descrição deste processo nestes vertebrados.

Comparado com outros sistemas bem conhecidos de autorrenovação do corpo, a espermatogênese é considerada como um dos que apresenta maior número de divisões celulares durante o seu desenvolvimento. Em várias espécies de mamíferos investigadas neste aspecto, tais como ratos, camundongos, hamster, ovino e suíno, uma espermatogônia-tronco passa por aproximadamente 10 divisões celulares antes de se tornar espermatócito, o qual sofre ainda duas divisões meióticas. Assim, teoricamente, uma espermatogônia-tronco é capaz de formar até 4096 espermatozoides em ratos por exemplo (França & Russell, 1998; de Rooij & Russell, 2000). O esquema a seguir ilustra a presumível seqüência de desenvolvimento das células espermatogênicas no rato e no camundongo (De Rooij, 2001), desde a espermatogônia isolada ( $A_{is}$ ) considerada como espermatogônia-tronco, até a formação de espermatídes:  $A_{is}$  (isolada)  $\rightarrow$   $A_{pr}$  (pareada)  $\rightarrow$   $A_{al}$  (alinhada, com várias gerações)  $\rightarrow$   $A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4 \rightarrow In \rightarrow B \rightarrow$  espermatócitos primários  $\rightarrow$  espermatócitos secundários  $\rightarrow$  espermatídes. As espermatogônias A do tipo isolada, pareada e alinhada são



funcionalmente consideradas espermatogônias indiferenciadas, enquanto as do tipo A<sub>1-4</sub>, intermediária (In) e do tipo B são diferenciadas. Apesar de este conceito estar sendo atualmente desafiado (Nakagawa et al., 2007), em termos morfológicos, no testículo de mamíferos, as espermatogônias-tronco são caracterizadas como as únicas espermatogônias sem pontes intercelulares (De Rooij & Russell, 2000) e, por isso, denominadas isoladas. Também merece ser mencionado que a última geração de espermatogônia do tipo A alinhada se diferencia em espermatogônia do tipo A<sub>1</sub>, não sofrendo, portanto, divisão mitótica.

Em mamíferos já foi demonstrado que as espermatogônias indiferenciadas (dentre elas encontra-se a espermatogônia-tronco) possuem localização preferencial (nicho) nos túbulos seminíferos (Chiarini-Garcia et al., 2001 e 2003). Por definição, nicho é o microambiente que fornece fatores e estímulos necessários para a auto-renovação e a retenção do estado indiferenciado das células-tronco, e geralmente é composto por três elementos: 1) *células de suporte*; 2) *células-tronco*; e 3) *matriz extracelular adjacente* (Spradling et al., 2001; Fuchs et al., 2004; Smith, 2006). Nos testículos dos mamíferos, o nicho é formado pelas espermatogônias-tronco, a membrana basal na qual estas espermatogônias estão apoiadas, e as células de Sertoli adjacentes, cuja interação física e parácrina com as espermatogônias têm se mostrado importante para a decisão do destino das mesmas (de Rooij et al., 2008; Kostereva & Hofmann, 2008; Oatley & Brinster, 2008; Chu et al., 2009). As células peritubulares mióides, que juntamente com as células de Sertoli, contribuem para a formação da membrana basal, podem também participar funcionalmente da constituição do nicho. No entanto, não existem ainda evidências de tal participação.

A exata localização dos nichos espermatogoniais, bem como os fatores envolvidos na manutenção, auto-renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco têm sido alvos de recentes pesquisas. Em roedores (camundongos, ratos e hamsteres), por exemplo, já foi demonstrado que as espermatogônias indiferenciadas estão preferencialmente distribuídas em regiões do túbulo seminífero adjacentes ao compartimento intersticial, onde se localizam as células de Leydig (Chiarini-Garcia et al., 2001; 2003; Nascimento et al., 2009). Talvez, não por coincidência, diminuição acentuada dos níveis intratesticulares de testosterona promovem maior eficiência do transplante de espermatogônias (Dobrinski et al., 2001). Enquanto níveis elevados deste andrógeno suprimem a diferenciação de espermatogônias mais imaturas (Meistrich & Shetty, 2003). Neste contexto, estudo mais

recente demonstrou que esta localização preferencial dos nichos de espermatogônias-tronco está relacionada com a distribuição dos vasos sanguíneos (Yoshida et al., 2007).

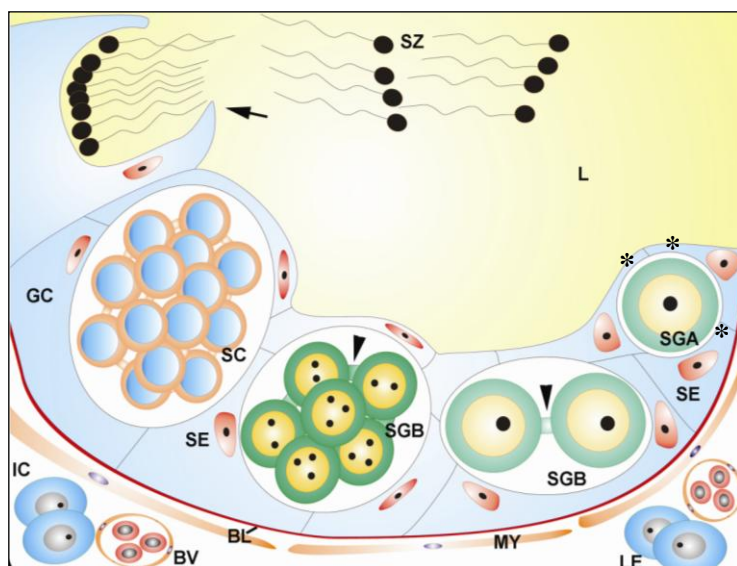
O número de células-tronco espermatogoniais no testículo adulto é pequeno, com estimativas variando de 3.000 a 25.000 em camundongos (Nagano 2003; Meistrich e van Beek, 1993; Tegelenbosch e de Rooij 1993) e 830.000 em ratos e (Orwig et al. 2002,b). Isto levou à investigação de marcadores específicos e características funcionais para identificação das espermatogônias-tronco em roedores. Até o presente momento, diversos marcadores (positivos ou negativos) têm sido utilizados com a finalidade de se enriquecer suspensões de células testiculares com espermatogônias. Dentre estes podem ser citados integrinas  $\beta_1^+$  e  $\alpha_6^+$ , integrina  $\alpha_v^-$ ,  $CD9^+$ ,  $CD24^+$ ,  $Thy-1^+$ ,  $c-kit^-$ ,  $MHC-I^-$ ,  $Stra\ 8$ ,  $Ep-CAM^+$ ,  $EE2^+$  (Shinohara et al., 1999; Kubota et al., 2003; Dobrinski, 2005a; Khaira et al., 2005; McLean, 2005). No entanto, marcadores específicos para este tipo celular ainda não foram elucidados.

Da mesma forma, apesar dos mecanismos de regulação da manutenção, auto-renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco não terem sido ainda bem esclarecidos, sabe-se que alguns fatores desempenham um papel crucial no estabelecimento e/ou na manutenção do estado indiferenciado das espermatogônias-tronco no testículo. São eles: GDNF (*glial cell-line derived neurotrophic factor*) e seu complexo de receptores  $GFR\alpha 1$  e c-RET, os fatores de transcrição ERM (ETV5) e Plzf (*promyelocytic leukemia zinc finger*), FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 2) e seu receptor FGFR2, o TAF4b (complexo da RNA polimerase), Activina A, BMP4 (*proteína morfogênica óssea 4*), *Sohlh1*, *Sox3* e *Neurog3*. (McLean 2005; Chen et al., 2005; De Rooij, 2006b; Yan, 2006; Hess et al., 2006; Cooke et al., 2006; He et al., 2007,2008; Hofmann, 2008; Lucas et al., 2009).

#### **1.4.2 - Espermatogênese em Teleósteos**

Nos peixes a espermatogênese ocorre no interior de estruturas denominadas espermatocistos, ou cistos espermatogênicos, que se formam quando uma espermatogônia primária ou do tipo A é completamente envolvida pelos prolongamentos das células de Sertoli (ver Figura 1 abaixo) (Grier, 1993; Pudney, 1993; 1995). Unidas entre si por complexos juncionais especializados, as células de Sertoli dos teleósteos delimitam física e funcionalmente um clone de células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento

(Batlouni et al., 2008a). Desta forma, à semelhança de outros vertebrados, as células de Sertoli fornecem às células germinativas suporte físico (sustentação) e fatores importantes para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das mesmas, estando ainda envolvida na intermediação hormonal (FSH e andrógenos), fagocitose de restos celulares (corpos residuais) e com a secreção do fluido testicular (Schulz & Miura, 2002; Weltzien et al, 2004; Cupp & Skinner, 2005). As células de Sertoli que delimitam os cistos espermatogênicos se apóiam na túnica própria, que é constituída pela membrana basal (camada acelular) e pelas células peritubulares mióides que possuem capacidade contrátil (Billard, 1982, Le Gac & Loir, 1999, Pudney, 1995). Portanto, diferentemente dos mamíferos, em peixes as células germinativas não estão em contato direto com a membrana basal (Billard, 1984; Schulz et al., 2010).



*Figura 1. Ilustração do arranjo cístico do epitélio seminífero dos peixes teleósteos. As células germinativas (SGA, SGB, SC) desenvolvem-se de forma sincrônica devido à presença de pontes citoplasmáticas (cabecças de setas). A espermatogênese ocorre no interior dos cistos, que são formados quando uma espermatogônia isolada (SGA) é envolvida pelos prolongamentos (asteriscos) das células de Sertoli (SE). Ao final do processo, os espermatozóides (SZ) atingem o lúmen do túbulo seminífero (L) através da espermiacção (abertura dos cistos) (seta). GC: compartimento tubular, BL: membrana basal, MY: células peritubulares mióides, IC: compartimento intertubular, LE: células de Leydig, BV: vaso sanguíneo. Adaptado de Nóbrega et al., 2009.*

Exceto pelo arranjo cístico, no qual as células germinativas se desenvolvem de forma sincronizada, provavelmente devido à presença de pontes intercelulares (Russell et al., 1990; Grier, 1993; Koulis et al., 2002), o processo espermatogênico de teleósteos assemelha-se muito ao de mamíferos. Durante a fase proliferativa ou espermatogonial, a espermatogônia primária ou do tipo A se divide e origina espermatogônias secundárias ou do tipo B que, depois de um número espécie-específico de divisões mitóticas, diferenciam-se em espermatócitos primários, iniciando a fase meiótica ou espermatocitária. Após a primeira divisão meiótica formam-se os espermatócitos secundários que num curto intervalo de tempo originam as espermátides haplóides através da segunda divisão meiótica. Em seguida ocorre a fase espermiogênica ou de diferenciação na qual as espermátides se transformam

em espermatozóides. Estes últimos, após abertura das junções entre as células de Sertoli, atingem o lúmen dos túbulos seminíferos, evento esse denominado de espermiacção (Silva, 1987; Miura, 1999; Le Gac & Loir, 1999; Schulz & Miura, 2002; Schulz, 2003).

Usualmente, a disposição da cromatina nuclear e o tamanho do núcleo, aliado ao número de células germinativas por cisto, são parâmetros utilizados como referências para se distinguirem os diferentes tipos espermatogoniais (tipo A e tipo B) (Matta et al., 2002; Vilela et al., 2003; Leal et al., 2009). As espermatogônias primárias são as maiores células da linhagem germinativa nas espécies de teleósteos (Schulz e Miura, 2002), apresentando um núcleo grande e claro, com pouca heterocromatina, contendo um ou dois nucléolos bastante evidentes (Miura, 1999). Em tilápias-nilóticas, apresentam um diâmetro nuclear médio de 10µm (Vilela, 2003). Após sucessivas divisões, a partir da espermatogônia primária, o número de espermatogônias secundárias por cisto aumenta geometricamente, enquanto o diâmetro nuclear das mesmas sofre gradual redução (Billard, 1969; Turner, 1919; Vaupel, 1929, Vilela et al., 2003). Os dados disponíveis na literatura mostram que o número de gerações espermatogoniais em teleósteos varia de 4-6 no zebrafish (*Danio rerio*; Ewing, 1972; Leal et al. 2009) a 14 no guppy (*Poecilia reticulata*; Billard, 1969); valores intermediários para o número de gerações de espermatogônias são observados em outras espécies de teleósteos (Le Gac & Loir, 1999; Miura, 1999; Ando et al., 2000). Em tilápias-nilóticas, a partir do número de células por cisto e do diâmetro nuclear/volume celular, foi verificada a existência de pelo menos oito gerações espermatogoniais. Uma geração de espermatogônia primária e sete diferentes gerações de espermatogônias secundárias ou do tipo B. (Vilela, et al., 2003; Schulz et al., 2005).

Diferentemente de mamíferos, a duração total do processo espermatogênico nos peixes é normalmente mais rápida (Silva, 1987; Koulisch et al., 2002; Vilela et al., 2003; Cardoso, 2007) e influenciada pela temperatura. Por exemplo, a duração conjunta das fases meiótica e espermiogênica é de aproximadamente 5-6 dias à 35 °C e de 10-11 dias à 25 °C em tilápias (*O. niloticus*) (Vilela et al., 2003; Lacerda et al., 2006). Além disso, estudos morfométricos em testículos tilápias têm demonstrado que a espermatogênese dos peixes é mais eficiente que a dos mamíferos já investigados. A maior eficiência da espermatogênese em arranjo cístico provavelmente ocorre devido a maior disponibilidade de fatores produzidos pelas células de Sertoli e ao menor número de apoptoses das células germinativas, resultando em maior capacidade de suporte (eficiência) das células de Sertoli.

Em tilápias e zebrafish, uma célula de Sertoli suporta aproximadamente 100 espermatídios, número este em média cerca de 10 vezes superior ao da maioria dos mamíferos estudados (Matta et al., 2002; Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005; Cardoso, 2007).

Outro aspecto peculiar da função testicular em peixes é a proliferação das células de Sertoli. Nos mamíferos, é considerado que a proliferação destas células ocorre somente no período fetal e pré-pubere, sendo, portanto o fator determinante na produção espermática nos animais sexualmente maduros, uma vez que cada célula de Sertoli suporta um número relativamente constante e espécie-específico de células germinativas (França & Russell, 1998; França & Chiarini-Garcia, 2005). Por apresentar crescimento contínuo na fase adulta, em peixes teleósteos sexualmente maduros a proliferação das células de Sertoli foi reportada em tilápias (*O. niloticus*) (Schulz et al., 2005), bagres africanos (*Clarias gariepinus*) (Schulz et al., 2005), zebrafish (*D. rerio*) (Leal et al., 2009) e no bacalhau (*G. morhua*) (Almeida et al., 2008). Nesses animais, a divisão das células de Sertoli ocorre principalmente quando as mesmas estão associadas com espermatogônias, de forma a garantir número adequado destas células somáticas para suportar o desenvolvimento das células germinativas durante a espermatogênese (Nóbrega et al., 2009). Portanto, a cada período reprodutivo dos teleósteos, a proliferação das células de Sertoli provavelmente é o fator primário responsável pelo aumento do testículo e da produção espermática (Schulz et al., 2005) sendo também controlada por fatores ambientais como a temperatura (Alvarenga, 2008).

À semelhança dos mamíferos, pouco se sabe a respeito das espermatogônias-tronco de peixes. Da mesma forma, características morfo-funcionais e/ou moleculares do nicho espermatogonial no testículo de teleósteos ainda não são conhecidas. Alguns autores consideram que as espermatogônias primárias ou do tipo A são as espermatogônias-tronco (Miura, 1999; Schulz & Miura, 2002). Nos peixes, estas espermatogônias apresentam as seguintes características morfológicas: núcleo volumoso contendo cromatina finamente granular, um ou dois nucléolos, e citoplasma com grande quantidade de “nuages”, que é um material elétron-denso, presumivelmente formado por ribonucleoproteínas e mRNAs de longa duração, como por exemplo mRNA de *vasa* ou *piwi* (genes específicos de células da linhagem germinativa) (Miura, 1999; Quagio-Grassiotto & Carvalho, 1999; Schulz & Miura, 2002). Recentemente, através de análises em microscopia eletrônica, foi sugerida a existência de duas subpopulações de espermatogônias A indiferenciadas em tilápias-

nilóticas. O primeiro tipo de espermatogônias A indiferenciadas é frequentemente encontrado próximo a túnica albugínea, apresenta grande quantidade de “nuages”, pouca heterocromatina, envelope nuclear convoluto e são consideradas células mais imaturas/indiferenciadas. O segundo tipo pode ser encontrado um pouco mais distante da túnica albugínea, possui o envoltório nuclear mais regular, quantidade reduzida de “nuages” e mais heterocromatina (Schulz et al., 2010). Uma condição similar parece acontecer no testículo de zebrafish (*D. rerio*) embora não exista uma localização específica para os dois tipos de espermatogônias A indiferenciadas observados nessa espécie (Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010). Embora marcadores moleculares específicos para espermatogônias-tronco em peixes ainda não sejam conhecidos, um primeiro candidato tenha sido recentemente proposto. Estudos combinando animais *vasa*-GFP transgênicos e técnica de microarray indicaram que o receptor transmembrana Notch1 seria uma molécula característica de espermatogônias A indiferenciadas em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yano et al., 2008 a e b).

Com exceção de alguns dados ainda incipientes disponíveis para a enguia japonesa (*Anguilla japonica*) (Miura et al., 2002; Miura et al., 2003; Miura & Miura, 2003; Miura et al., 2006), praticamente não existem estudos a respeito da regulação da auto-renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco em peixes. Conforme mostra a Figura 2 a seguir, na enguia japonesa dois fatores são considerados como fortes candidatos para a regulação da auto-renovação e diferenciação dessas células 1) o PD-ECGF, fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaqueta, também conhecido como eSRS34 (eel Spermatogenesis Related Substance 34) ou “fator de renovação das espermatogônias-tronco”; e 2) o AMH que é o hormônio anti-Mülleriano, também conhecido como eSRS21 (eel Spermatogenesis Related Substance 21) ou “substância inibidora da espermatogênese”. Sob a influência do estradiol-17 $\beta$  (E2), secretado pelas células de Leydig, as células de Sertoli produzem o PD-ECGF, que estimula a renovação das espermatogônias-tronco. No entanto, quando se adiciona anticorpo específico anti-PD-ECGF à co-cultura de células de Sertoli/células germinativas, a auto-renovação das espermatogônias-tronco induzida pelo E2 é bloqueada (Miura et al., 2003). Outros experimentos mostram que o hormônio anti-Mülleriano (AMH), produzido pelas células de Sertoli, é responsável pela inibição da diferenciação espermatogonial e pelo bloqueio da proliferação das espermatogônias do tipo B como também mostrado na figura 2 (Miura et al., 2002; Miura et al., 2006). A expressão

deste hormônio é reprimida pela 11-cetotestosterona (11-KT), que em peixes é o principal andrógeno sintetizado pelas células de Leydig. Outros fatores como o IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina 1) e a activina B (ver Figura 2) parecem também intervir na diferenciação e proliferação espermatogonial. Na enguia japonesa, por exemplo, sob influência da 11-KT as células de Sertoli produzem a activina B que estimula a proliferação das espermatogônias B, porém sem iniciar a meiose. Já o IGF-I que induz a síntese de DNA nas espermatogônias de truta arco-íris (*O. mykiss*), permite a continuidade da espermatogênese induzida pela 11-KT na enguia japonesa (Miura & Miura, 2003). Em tilápias (*O. niloticus*), estudos *in vitro* têm demonstrado que o IGF e/ou o hCG (gonadotrofina coriônica humana) promovem a mitose espermatogonial e o início da meiose na presença de 11-KT (Tokalov & Gutzeit, 2005). Portanto, em síntese, os dados disponíveis para a enguia japonesa mostram que a auto-renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco nos peixes parecem ocorrer em função do balanço adequado de fatores.

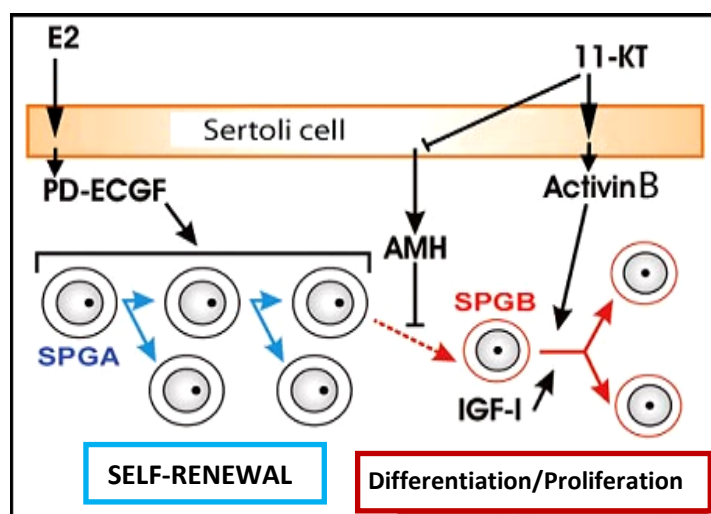


Figura 2. Esta figura mostra a distribuição das principais vias e fatores envolvidos na auto-renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco nos peixes. SPGA = espermatogônia do tipo A; SPGB = espermatogônia do tipo B; E2 = estradiol-17β; PD-ECGF = fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaqueta; 11-KT = 11-cetotestosterona; AMH = hormônio anti-Mülleriano; IGF-I = fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I; → = sinal estimulatório; ⊥ = sinal inibitório. Modificado de Miura & Miura, 2003.

### 1.5- TRANSPLANTE DE ESPERMATOGÔNIAS

O transplante de espermatogônias é uma fascinante abordagem experimental que consiste na remoção de células tronco do testículo de um animal doador e a transferência das mesmas para o testículo de um receptor infértil, onde estas células irão se desenvolver e formar espermatozoides maduros com características genéticas do doador (ver Figura 3 abaixo). Esta nova e promissora metodologia foi desenvolvida em camundongos por Brinster

e colaboradores (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994) e tem se tornado uma valiosa abordagem para se investigar a biologia da espermatogônia tronco no testículo, bem como caracterizar os nichos espermatogoniais e verificar os efeitos da manipulação *in vitro* na função das espermatogônias-tronco (Orwig & Schlatt, 2005; McLean, 2005). O transplante de espermatogônias também tem proporcionado enormes avanços no estudo da espermatogênese em si, das interações entre células de Sertoli e células germinativas, além de pesquisas em potencial na área de produção animal, preservação de espécies ameaçadas de extinção, medicina reprodutiva e produção de animais transgênicos (McLean, 2005; Orwig & Schlatt, 2005; Hill & Dobrinski, 2006; Dobrinski, 2006 e 2008; Kanatsu-Shinohara et al., 2008).

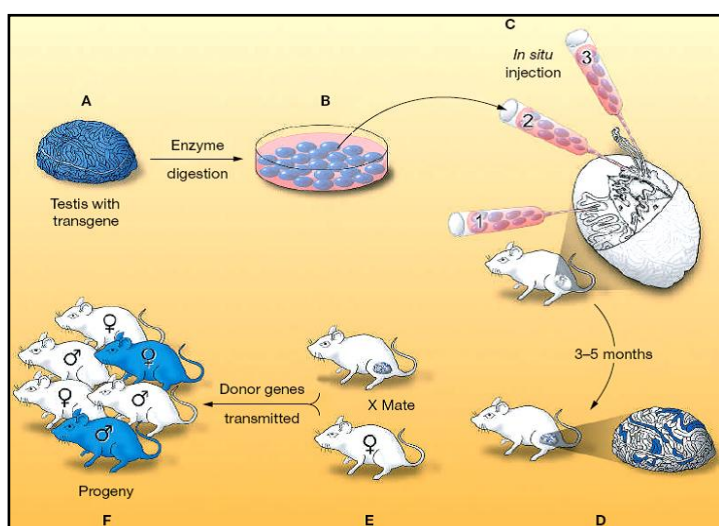


Figura 3. Principais fases do transplante de espermatogônias em camundongos. Retirado de Kubota & Brinster (2006). A = testículo do animal transgênico que expressa o gene da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*); B = suspensão de células germinativas obtidas através de digestão enzimática; C = transplante das células germinativas através dos túbulos seminíferos (1), rete testis (2), e ductos eferentes (3); D = testículo transplantado com células germinativas do doador; E = cruzamento do animal transplantado com fêmea normal; F = progênie do receptor portando características genéticas do camundongo doador transgênico.

Um avanço muito importante propiciado por esta técnica foi o sucesso na produção de gametas xenogênicos a partir dos transplantes interespecíficos de espermatogônias-tronco de rato para camundongo e de hamster para camundongo (Clouthier et al., 1996; Ogawa et al., 1999). Nesta situação de transplante interespecíficos (xenogênico), os camundongos receptores eram mutantes imunodeficientes como o *nude mice* (sem linfócitos T) ou camundongos SCID (*severe combined immune deficiency* - sem linfócitos B e T). A produção de espermatozoides de camundongos nos testículos de ratos também foi demonstrada após o transplante de espermatogônias (Ogawa et al. 1999; Zhang et al. 2003). Nesse sentido, além de roedores, células germinativas de coelhos, cães, gatos, animais domésticos de grande porte (suínos, bovinos, eqüinos) e primatas (babuíno, macaco rhesus, e humanos)



foram também transplantadas para testículos de camundongos imunodeficientes. No entanto, embora diferentes graus de colonização tenham ocorrido, espermatogênese além da fase espermatozoal não foi observada (Dobrinski et al., 1999; Dobrinski et al., 2000; Reis et al., 2000; Nagano et al., 2001b; Nagano et al., 2002b; Kim et al. 2006). Acredita-se que o êxito do transplante esteja diretamente relacionado com o grau de proximidade filogenética das espécies durante a evolução e não com uma possível incompatibilidade imunológica, uma vez que o compartimento adluminal dos túbulos seminíferos, e mesmo o testículo como um todo, é considerado um ambiente imunoprivilegiado (Bart et al., 2002; Nasr et al., 2005). Sabe-se que a barreira formada pelas junções de oclusão das células de Sertoli protege as células espermatogênicas após a ocorrência da meiose. Esta implicação foi corroborada em estudos avaliando-se camundongos que apresentavam deleção genética para as proteínas de junção de oclusão celular, como ocludinas (Saitou et al., 2000), claudinas 11 (Gow et al., 1999) e claudinas 5 (Morrow et al., 2009), os quais mostravam túbulos seminíferos formados somente por células de Sertoli. A barreira de célula de Sertoli ou barreira hemato-testicular foi tema de recente revisão (Lui & Cheng, 2007). Entretanto, conforme é conhecido, as espermatogônias transplantadas localizam-se no compartimento basal, próximo à membrana basal, sem a proteção da barreira formada pela célula de Sertoli. Dessa forma, o CD95 (Fas ligante), sintetizado pela célula de Sertoli, foi inicialmente sugerido como principal fator promotor da imunoproteção observada no testículo (Bellgrau et al., 1995), uma vez que provoca apoptose em linfócitos T. No entanto, estudos mais recentes tem mostrado que o ambiente imunoprivilegiado observado no testículo é multifatorial, envolvendo também a atuação de andrógenos na modulação da resposta imune (Fijak & Meinhardt 2006).

A menor eficiência do transplante entre hamsteres e camundongos (divergem em ~16 milhões de anos), comparado com o transplante entre ratos e camundongos que são espécies consideradas mais próximas evolutivamente (10-11 milhões de anos) (Catzefliz et al., 1993; Clouthier et al., 1996; Ogawa et al., 1999), provavelmente ilustra a influência da filogenia no sucesso do transplante. Provavelmente, esta limitação ocorra devido à falhas ou incompatibilidade na associação estrutural e interações funcionais entre as células de Sertoli do animal receptor e as células germinativas transplantadas (Khaira et al., 2005). Esta incompatibilidade entre as células germinativas do doador e o microambiente testicular

receptor pôde ser minimizada através do co-transplante de células germinativas e células de Sertoli (Shinohara et al., 2003).

Em outra vertente, o sucesso do transplante de células germinativas criopreservadas (Avarbock et al., 1996; Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Wang et al., 2008) e cultivadas (Brinster & Nagano, 1998; Nagano et al., 1998) foram também avanços bastante importantes conseguidos através desta técnica. Pois, diferentemente do congelamento de sêmen onde uma quantidade finita de células é preservada, o congelamento e o armazenamento de células germinativas permitem preservar indefinidamente as linhagens de células espermato gênicas de espécies em extinção, animais experimentais valiosos ou animais de alto valor zootécnico. Outro aspecto muito importante a ser considerado é que o congelamento de espermatogônias preserva todo o potencial genético do macho, ao possibilitar que após o transplante essas células continuem replicando e sofrendo recombinação gênica (*crossing-over*) durante a meiose garantindo assim, a variabilidade genética (Dobrinski, 2005a). Num contexto bem amplo, as espermatogônias tronco podem ser consideradas 'imortais' (Avarbock et al., 1996). Esta técnica também tem sido utilizada para restaurar a espermatogênese em camundongos mutantes naturalmente inférteis (Ogawa et al., 2000; Ohta et al., 2000; Shinohara et al., 2003). Mesmo com este enorme potencial de utilização, deve ser ressaltado que a eficiência do transplante é ainda relativamente baixa, merecendo, dessa forma, ser investigada mais acuradamente (Griswold et al., 2001; Aponte et al., 2005; McLean, 2005; Ehmcke et al., 2006b).

Recentemente, vários estudos obtiveram sucesso no transplante singênico de animais de grande porte com interesse zootécnico, como caprinos (Honaramooz et al., 2003a e 2003b), ovinos (Rodriguez-Sosa et al., 2006 e 2009), bovinos (Izadyar et al., 2003; Herrid et al., 2006) e suínos (Mikkola et al., 2006). Além disso, o transplante singênico tem sido aplicável em macacos (Schlatt et al., 2002; Hermann et al., 2007) que em tese são modelos experimentais para humanos e também em felinos (Campo-Silva, 2009). Nestes experimentos, as células germinativas doadoras foram marcadas antes do transplante para o acompanhamento do desenvolvimento das mesmas no testículo receptor através da utilização do corante fluorescente PKH26GL (*Red Fluorescent Cell Linker*) (Honaramooz et al., 2003a; Herrid et al., 2006); do CFDA-SE (*Carboxy Fluorescein Diacetate Succinyl Diester*) (Herrid et al., 2006, Rodriguez-Sosa et al., 2006); da lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*) (Izadyar et al., 2003) e do BrdU (Bromodeoxiuridina) (Schlatt et al., 2002). Outros estudos

utilizaram ainda animais transgênicos (Honaramooz et al., 2003a) ou animais que apresentavam defeito na espermatogênese como modelo receptor (Mikkola et al., 2006). Diferentemente dos transplantes de células germinativas realizados em roedores, nos quais se utilizaram doadores e receptores geneticamente idênticos ou imunodeficientes no caso dos xenotransplantes, em mamíferos de grande porte os transplantes foram realizados com sucesso em animais imunocompetentes e geneticamente diferentes. Conforme anteriormente mencionado, o testículo é considerado um local imuno-privilegiado, entretanto não está claro por que o transplante de células germinativas entre animais antígenicamente distintos e imunocompetentes é possível em espécies de animais domésticos, mas não em roedores.

Antes de serem transplantadas, o isolamento das células germinativas é realizado através de modificação do procedimento relatado originalmente por Bellvé et al. (1977), no qual o testículo do animal doador é dissociado utilizando-se protocolo de digestão enzimática dupla (tripsina e colagenase). Após lavagem em meio de cultura rotineiro, as células espermatogênicas são ressuspensas e diluídas em concentrações desejadas, sendo as mesmas transplantadas diretamente nos túbulos seminíferos através de micropipetas (~50 µm de diâmetro) (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Clouthier et al., 1996). Em trabalhos posteriores, estas células foram também injetadas na *rete testis* e nos ductos eferentes (Ogawa et al., 1997). Em animais de grande porte, foi demonstrado que a melhor via de transplante é através *da rete testis* (guiada por ultrasonografia) ou através da rede extratesticular, localizada entre a rede intratesticular e os ductos eferentes (Schlat et al., 1999; Honaramooz et al., 2002a, 2003a, b; Rodriguez-Sosa et al., 2006). Com a finalidade de se monitorar a viabilidade das células germinativas e o percentual de túbulos seminíferos preenchidos com a suspensão celular, o corante vital azul de tripan é normalmente utilizado (Honaramooz et al., 2002a, Ogawa et al., 1997).

O microambiente testicular dos animais receptores tem um papel crucial na dinâmica e na eficiência da colonização e desenvolvimento das células germinativas transplantadas. Embora as células germinativas de animais doadores sejam capazes de colonizar o testículo de um animal receptor normal, a eficiência do transplante depende do sucesso na competição entre células germinativas transplantadas e células germinativas endógenas por nichos disponíveis nos túbulos seminíferos (Shinohara et al., 2001, 2002). O receptor ideal para o transplante de espermatogônias é o testículo cujos túbulos seminíferos não

apresentem espermatogênese endógena, mas contenham células de Sertoli normais, pois este aspecto garante a acessibilidade dos nichos às células germinativas dos doadores (Brinster et al, 2003). Assim, por apresentarem células de Sertoli completamente diferenciadas e normais, (Kurohmaru et al., 1992), os camundongos mutantes  $W/W^V$  constituem excelente modelo experimental para serem utilizados como receptores. Esses animais apresentam deficiência nos receptores tirosina kinase c-kit. Como o complexo receptor c-kit/SCF é essencial para a proliferação e diferenciação das espermatogônias (De Rooij & Russel, 2000) além de estar associado à migração e proliferação das células germinativas primordiais durante a embriogênese (Mintz & Russell, 1957), os camundongos  $W/W^V$  possuem poucas ou nenhuma célula germinativa no epitélio seminífero. Outro modelo experimental também utilizado como receptor é o camundongo mutante *jsd* (juvenile spermatogonial depletion) (Boettger-Tong et al., 2000) já que essa mutação resulta na produção de uma única onda espermatogênica seguida de falha na repopulação do testículo pelas espermatogônias tronco. Da mesma forma, o camundongo homocigoto mutante Luxoid (*lu/lu*), nos quais ocorre a perda da capacidade de autorenovação das células tronco (controlado pelos genes *Plzf*), e que possui células de Sertoli normais, apresenta-se como outro receptor viável para transplantes (Buaas et al. 2004).

Animais com espermatogênese completa podem também ser empregados como receptores no transplante. No entanto, antes do transplante, estes animais devem ter sua espermatogênese endógena depletada. Assim, com este objetivo, os mesmos são tratados com a droga quimioterápica busulfan (1,4-dimetanosulfonoxibutano) (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Ogawa et al., 1999; Brinster et al., 2003; Moisan et al., 2003; Honaramooz et al., 2005;) ou com irradiação (van den Aardweeg et al., 1983; Shuttlesworth et al., 2000; Creemers et al., 2002, Giuli et al., 2002; Schalatt et al., 2002; Izadyar et al., 2003; Honaramooz et al., 2005; Oatley et al., 2005; Kim et al., 2006). Os efeitos citotóxicos do busulfan se devem, principalmente, a promoção de ligações cruzadas no DNA através da transferência de radicais alquil aos nucleotídeos, levando, assim, à morte celular em tecidos com alto índice de proliferação, a exemplo do epitélio dos túbulos seminíferos. A dosagem de busulfan efetiva para destruir as células espermatogênicas é muito variada nas diferentes espécies, ou mesmo linhagens, e o tratamento pode ser letal devido ao seu efeito supressor na função da medula óssea (Ogawa et al., 1999; Brinster et al., 2003; Campos-Silva, 2009). A administração de busulfan durante o período fetal (*in utero*) tem sido utilizada

como alternativa para suprimir a espermatogênese endógena em animais domésticos de forma mais eficiente e com menos efeitos adversos (Honaramooz et al., 2005). Mesmo quando o tratamento com busulfan é eficaz, nem todas as espermatogônias tronco são destruídas nos testículos receptores (Bucci & Meistrich, 1987). Desta forma, a depleção induzida pelo busulfan é reversível, uma vez que, parte da espermatogênese endógena pode ainda persistir ou mesmo se recuperar após o tratamento. Outra maneira de promover a depleção das células germinativas é a utilização da irradiação local dos testículos (Izadyar et al. 2003; Honaramooz et al. 2005; Oatley et al. 2005; Kim et al., 2006 e 2008). O efeito citotóxico das radiações ionizantes assim como o busulfan se deve aos danos causados as moléculas de DNA. O índice de depleção pode alcançar 99% (Creemers et al., 2002). Entretanto, esta irradiação, quando aplicada em todo o corpo do animal, compromete todos os sistemas autorrenováveis, semelhante às drogas quimioterápicas. Dessa forma, estudos mais recentes têm irradiado somente a região do testículo, mantendo-se assim a integridade física e funcional dos demais sistemas autorrenováveis. Conforme mostrado em vários trabalhos, um maior índice de depleção nas células germinativas foi obtido quando o testículo foi submetido à irradiação fracionada (duas doses) (de Ruiter-Bootsma et al. 1977; van Der Meer et al. 1993; Creemers et al., 2002; Campos-Silva,2009).

Várias estratégias abordando tanto o doador quanto o receptor têm sido empregadas visando melhorar a eficiência do transplante. Dentre estas podem ser citadas a utilização de drogas que diminuam a concentração intratesticular de testosterona no doador (Dobrinski et al., 2001) ou a associação de tratamentos hormonais (estradiol e leuprolide) com o busulfan (Ogawa et al., 1998; Ogawa et al., 1999; Vecino et al., 2001) melhorando assim as condições do microambiente testicular receptor. A maior eficiência da técnica de transplante de células germinativas requer a obtenção de populações celulares enriquecidas em espermatogônias-tronco. Pois, dentre as diversas células do processo espermatogênico que podem ser transplantadas nos túbulos seminíferos, e eventualmente formarem espermatozóides, apenas as espermatogônias-tronco tem a capacidade de se auto-renovarem e de formarem continuamente células germinativas mais maduras (Brinster & Zimmermann, 1994; Brinster & Avarbock, 1994). Metodologias empregando o criptorquidismo experimental e seleção de espermatogônias imaturas, com o objetivo de aumentar o número de células tronco a serem transplantadas (Shinohara et al., 2000; Shinohara & Brinster, 2000), e a utilização de doadores e receptores mais jovens (Shinohara et al., 2000; Honaramooz et al., 2002a),

também têm sido utilizadas. Ainda nesse sentido, McLean e colaboradores (2002) demonstraram que a utilização de camundongos doadores deficientes em vitamina A ou aqueles cujos testículos sofreram hipertermia (43° C por 15 minutos), resultou em maior eficiência do transplante. Da mesma forma, o fracionamento e a seleção das células germinativas, através de gradiente de densidade utilizando Percoll, resultou em maior eficiência do transplante quantificada através do maior número de colônias e áreas com células espermatogênicas encontradas no receptor, algumas semanas após o transplante (Koh et al., 2004).

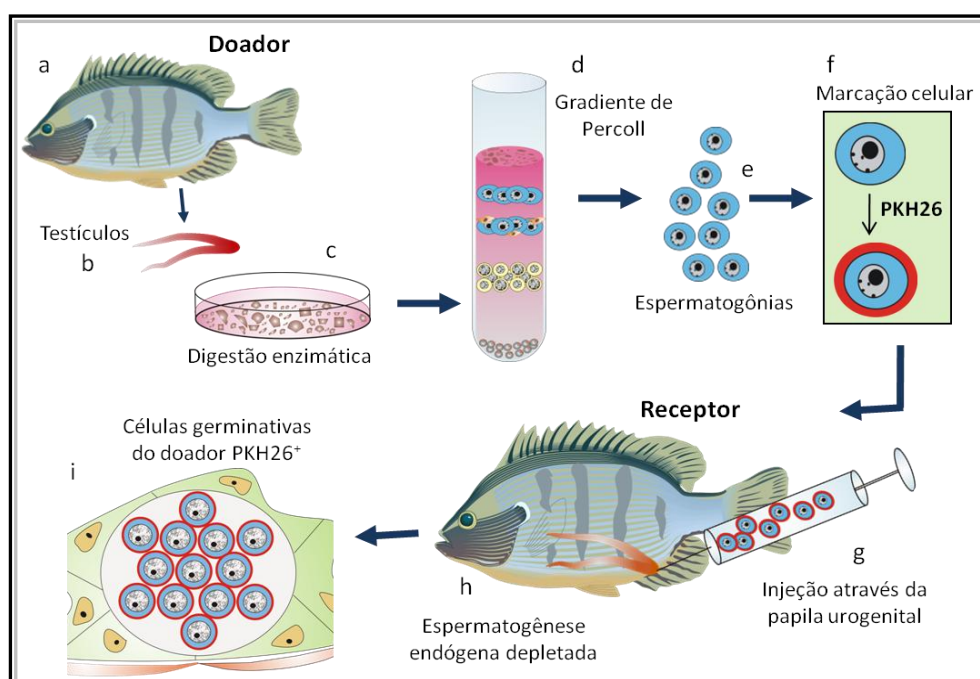
Pelo fato de as espermatogônias tronco, inicialmente, se auto-renovarem por cerca de dez a quinze dias após o transplante (Parreira et al., 1998; Nagano et al., 1999; Ohta et al., 2000), a partir de dois meses após o transplante é possível identificar em camundongos as células espermatogênicas (espermátides) originadas da espermatogônia-tronco dos doadores (Parreira et al., 1998). Esta identificação pode ser feita através de transgenes marcadores que persistem por várias gerações sucessivas como, por exemplo, o *LacZ* da  $\beta$ -galactosidase que se cora em azul através de técnicas específicas (X-gal) para detecção desta enzima (Brinster & Avarbock, 1994), o *gfp* que codifica a proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) (Ohta et al., 2000), ou ainda, pela utilização de outros modelos transgênicos *Ngn3/CreERTM*, *CAG-CAT-Z*, *CAG-CAT-EGFP* (Araki et al., 1995; Kawamoto et al., 2000; Yoshida et al., 2004 e 2007). Além destes marcadores, as células germinativas, principalmente espermátides e espermatozóides de espécies diferentes, podem também ser prontamente distinguidas no epitélio seminífero e epidídimo do receptor através de características morfológicas específicas, tais como, a forma e o grau de condensação da cabeça da espermátide, e o posicionamento das organelas dentro das células (Russell et al., 1996; França & Russell, 2000). Quando não há disponibilidade de modelos animais transgênicos ou não é possível utilizar marcadores morfológicos, como já citado, em alguns estudos, o corante fluorescente lipofílico PKH26GL tem sido usado como alternativa para acompanhar o desenvolvimento das células transplantadas (Honaramooz et al., 2002a; Honaramooz et al., 2003a; Herrid et al., 2006; Lacerda et al., 2006 e 2008). Este marcador é constituído de moléculas de cadeia alifáticas longas conjugadas ao fluorocromo TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina) que se intercalam na bicamada lipídica da membrana celular. Assim, ao se ligar de forma estável as regiões lipídicas da membrana celular, o PKH26 permite, através da emissão de luz de cor vermelha, a identificação em microscópio de

fluorescência das células injetadas dentro do testículo receptor por um período relativamente longo.

Dentre inúmeras outras possibilidades o transplante de células germinativas pode ser utilizado para se investigar a função testicular. Um exemplo bastante ilustrativo da aplicabilidade do transplante de espermatogônias, para responder importantes aspectos funcionais sobre o processo espermatogênico e seus mecanismos de regulação, foi o experimento mostrando que o genótipo da própria célula germinativa é responsável pela determinação da duração da espermatogênese (França et al., 1998). Conforme é sabido na literatura, esta duração é rigidamente estabelecida para cada espécie (França & Russell, 1998). Assim, as células somáticas, particularmente a célula de Sertoli, não influenciam o ritmo de desenvolvimento das células germinativas. Esta importante descoberta serve como paradigma para outros sistemas de auto-renovação do corpo (Weglarz & Sandgren, 2000). Ainda ilustrando a aplicabilidade do transplante de células germinativas em estudos funcionais, a formação de espermatozoides férteis em camundongos normais, a partir do transplante de células germinativas de camundongos *knockout* para receptor de estrógeno do tipo  $\alpha$  (Mahato et al., 2000) e receptores de andrógenos (Johnston et al., 2001), mostrou que estes receptores não são necessários para o desenvolvimento do processo espermatogênico. Em outra abordagem bastante interessante, foi demonstrado que o transplante de espermatogônias de camundongo doador infértil (Sl/Sl), devido à ausência do ligante para c-kit (Stem Cell Factor) produzido pelas células de Sertoli, resultou no desenvolvimento do processo espermatogênico em camundongos receptores também inférteis (W/W) (Ogawa et al., 2000). Vários outros aspectos importantes para a função testicular têm sido investigados nos últimos anos (Dobrinski, 2005a e b; Khaira et al., 2005; McLean, 2005). Merece ser ressaltado que, através da utilização da técnica de transplante de espermatogônias tronco isoladas de camundongos com leucemia, a fertilidade foi restaurada, sem induzir a leucemia, após os camundongos terem sofrido tratamento quimioterápico (Fujita et al., 2005). Portanto, estes estudos ilustram com bastante veemência a aplicabilidade desta fascinante metodologia.

## **1.6- TRANSPLANTE DE ESPERMATOGÔNIAS EM PEIXES**

Na mesma linha dos estudos desenvolvidos em mamíferos por Brinster e colaboradores, o transplante de espermatogônias foi também desenvolvido com sucesso no Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG em peixes teleósteos, a partir de estudos feitos por Lacerda e colaboradores (2006). Essa metodologia, inédita para esse grupo de vertebrados, foi padronizada e estabelecida utilizando-se a tilápia-nilótica como modelo experimental. Desta forma, mostrou-se que espermatogônias transplantadas diretamente nos testículos de tilápias adultas são capazes de sobreviver, colonizar e proliferar nos túbulos seminíferos receptores (ver Figura 4 abaixo).



*Figura 4. Diagrama ilustrativo das principais etapas do transplante de espermatogônias em tilápias-nilóticas (*O. niloticus*), conforme estudos desenvolvidos por Lacerda e colaboradores (2006). Resumidamente, as etapas do transplante na tilápia consistem na remoção dos testículos dos doadores (a, b), os quais são fragmentados e submetidos à digestão enzimática (c) para se obter a suspensão celular. Esta suspensão é centrifugada em gradiente de percoll (d) e, em seguida, submetida a um plaqueamento diferencial (e) com a finalidade de se obter um pool de espermatogônias. Por se ligar de forma duradoura na membrana citoplasmática, o corante fluorescente PKH26 é utilizado como marcador das espermatogônias (f) a serem transplantadas. A via de transplante é através da papila urogenital (g) dos receptores que tiveram sua espermatogênese endógena suprimida com busulfan + temperatura de 35oC (h). Cada tilápia recebeu uma injeção de suspensão celular contendo cerca de  $10^7$  espermatogônias por mL. Para se avaliar a presença das células marcadas com PKH26, as tilápias transplantadas foram sacrificadas em diversos intervalos de tempo pós-transplante. Algumas semanas após o transplante, cistos espermatogênicos marcados foram observados (i).*



Takeuchi e colaboradores (2003) reportaram uma técnica para o transplante de células germinativas primordiais (PGCs, células precursoras dos gonócitos que originam oogônias e espermatogônias) em trutas arco-íris (*O. mykiss*). Neste estudo, PGCs de trutas GFP transgênicas foram isoladas e transplantadas dentro da cavidade celomática de larvas recém eclodidas da mesma espécie. A verificação posterior de células GFP positivas nas gônadas dos receptores indicou que as PGCs dos doadores migraram para as gônadas dos peixes receptores, proliferaram e se diferenciaram em espermatogônia ou ovogônia, dependendo do sexo genético do indivíduo receptor. Além disso, quando ovos de trutas foram inseminados com o ejaculado de machos transplantados, embriões apresentando genótipo do doador (carreando o gene *gfp*) foram produzidos com sucesso. Trabalhos seguintes demonstraram o êxito do transplante xenogênico de PGCs entre truta arco-íris e salmão masu (*Oncorhynchus masou*) (Takeuchi et al., 2004). Em estudos mais recentes, foi observada a produção de ovócitos a partir de espermatogônias provenientes de trutas arco-íris adultas transplantadas na cavidade celomática de larvas da mesma espécie. Demonstrando assim, a grande plasticidade e bipotencialidade que espermatogônias apresentam mesmo após os machos terem atingido a maturidade sexual (Okutsu et al., 2006a).

A produção de trutas arco-íris viáveis a partir do transplante de PGCs criopreservadas também foi obtida (Kobayashi et al., 2006). Dando continuidade a esta linha de pesquisa, foram geradas trutas a partir do transplante de PGCs na cavidade celomática de larvas de salmões triplóides que, naturalmente apresentam raras células germinativas endógenas em suas gônadas e, por isso são inférteis (Okutsu et al., 2007). Para ampliar ainda mais este cenário, um sistema *in vitro* que permite a expansão do número de espermatogônias do tipo A, antes das mesmas serem transplantadas, foi recentemente estabelecido para truta arco-íris (Shikina et al., 2008). Ainda Majhi e colaboradores (2009) utilizando-se procedimento cirúrgico para transplantar espermatogônias de peixe-rei (pejerey, *Odontesthes bonariensis*) diretamente nos testículos de peixe-rei patagônicos (Patagonian pejerey, *O. hatcheri*) também verificaram, vários meses após o transplante, a produção de gametas xenogênicos (Maihi et al., 2009).

Em outra vertente, Saito e colaboradores (2008) evidenciaram que PGCs de zebrafish (*D. rerio*), quando microinjetadas em blástulas de danio pérola (*D. albolineatus*), são capazes de se incorporar ao embrião, dando origem a quimeras que produzem espermatozóides

funcionais com características genéticas do doador. Estendendo este estudo, os mesmos pesquisadores demonstraram que PGCs isoladas de goldfish (*Carassius auratus*) e dojô (*Misgurnus anguillicaudatus*) são também capazes de se diferenciar em espermatozóides quando transplantadas em zebrafish no estágio de blástula.

Recentemente, o primeiro sistema de transplante singênico de espermatogônias em teleósteo marinho foi desenvolvido (Takeushi et al., 2009). Assim, empregando-se a técnica já estabelecida em salmonídeos para o transplante intraperitoneal de células germinativas em larvas recém eclodidas, foi demonstrado a incorporação de espermatogônias de roncadeira-japonesa (nibe croaker, *Nibe mitsukurii*) nos testículos dos peixes receptores. Porém, nessa investigação foi evidenciado que as espermatogônias exógenas são somente capazes de colonizar os testículos quando transplantadas num período curto do desenvolvimento das larvas receptoras (4-6 mm de comprimento). Em estudo subsequente investigou-se a viabilidade de cavalas-pacíficas (chub mackerel, *Scomber japonicus*), como modelo receptor do transplante xenogênico de espermatogônias. Dessa forma, células germinativas de roncadeira-japonesa (*N. mitsukurii*) foram microinjetadas na cavidade celomática de larvas de chub mackerel. As avaliações realizadas mostraram que o microambiente somático das gônadas receptoras é capaz de suportar a colonização, sobrevivência e proliferação das células germinativas exógenas transplantadas (Yazawa et al., 2010).

### **1.7- Perspectivas do transplante de espermatogônias**

A partir do que foi mencionado anteriormente pode ser inferido que o futuro da técnica de transplante de espermatogônias é bastante promissor. Por exemplo, a possibilidade de melhoramento do potencial reprodutivo de animais de produção, através da manutenção por tempo indeterminado do estoque genético de machos com alto valor zootécnico, é bastante viável. Da mesma forma, a reprodução e a preservação do plasma germinal de espécies ameaçadas de extinção poderão ser feitas através do transplante de espermatogônias tronco para espécies filogeneticamente próximas. Alternativamente, estas células podem ser congeladas até que um receptor adequado para manter a linhagem germinativa esteja disponível.

A técnica do transplante de espermatogônias tem também propiciado novas possibilidades para a manipulação genética de células germinativas. Particularmente, como essa metodologia permite a produção de progênie carregando genes provenientes de células germinativas isoladas do doador, a mesma tem se tornado uma tecnologia alternativa em contraposição à modificação de células-tronco-embrionárias para gerar de animais transgênicos e *Knockouts* (Hamra et al., 2002; Orwig et al., 2002a). Neste contexto, Nagano e colaboradores (2001b) foram capazes de produzir camundongos transgênicos através da transdução retroviral de células-tronco germinativas transplantadas. Ratos transgênicos também foram produzidos através de transfecção lentiviral, retroviral e por vírus adeno-associado recombinante de espermatogônias, seguida do transplante (Hamra et al., 2002; Orwig et al., 2002a; Kanatsu-Shinohara et al., 2008). Além disso, essa abordagem vem se estendendo a um grande número de animais de interesse econômico. O uso de vetor viral adeno-associado para transferência de genes e produção de células germinativas transgênicas de suínos tem sido também demonstrado (Honaramooz et al., 2003c). Juntamente com a recombinação homóloga das células germinativas (Guillaudoux et al., 2000; Celebi et al., 2002), esta rota de engenharia genética além de ser mais simples e barata, tem enorme potencial de uso em animais que ainda não possuem a tecnologia de modificação das células tronco embrionárias desenvolvida, disponível ou eficiente. Especialmente agora que, com o advento da fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), menor número de espermatozóides é requerido para que a gestação ocorra. Além disso, recentemente alguns autores têm injetado espermátide arredondada no ovócito e obtido progênie fértil (Haigo et al., 2004; Ohta et al., 2009; Kanatsu-Shinohara, 2006).

Pelo fato de muitas das causas de infertilidade humana não serem tratáveis, o transplante de espermatogônias também irá beneficiar bastante a reprodução em indivíduos desta espécie. Outro potencial uso clínico desta técnica para o homem é o transplante de células germinativas em pacientes cuja espermatogênese endógena foi eliminada ou danificada através de tratamento quimio ou radioterápico. A retirada e o congelamento de células-tronco para serem transplantadas no testículo do mesmo indivíduo, após o tratamento, é uma possibilidade a ser considerada, principalmente se esse indivíduo for jovem e ainda incapaz de produzir espermatozóides para serem criopreservados.

Ampliando ainda mais estas perspectivas e contrapondo o limite filogenético do transplante em mamíferos, o enxerto de fragmentos testiculares de algumas espécies de mamíferos (camundongo, suíno, caprino, macaco rhesus) sob a pele de camundongos *nude mice* castrados, tem sido desenvolvido como alternativa ao transplante de células germinativas isoladas (Honaramooz et al., 2002b; Schlatt et al., 2003; Honaramooz et al., 2004; Dobrinski, 2005a e b). Nestes estudos a produção de espermatozóides normais e viáveis foi demonstrada. A sobrevivência e maturação de fragmentos de testículo de cavalos imaturos ou criptorquídicos enxertados em camundongos imunodeficientes também foram demonstradas (Turner et al., 2005; Rathi et al., 2006). Em conjunto, estes resultados indicam que os mecanismos de regulação da espermatogênese em mamíferos estão bastante conservados durante a evolução. Portanto, a técnica de transplante de fragmentos de testículos também apresenta enormes possibilidades de aplicação na biologia da reprodução de mamíferos (Dobrinski, 2005a; Dobrinski, 2007; Rodriguez-Sosa & Dobrinski, 2009) podendo ser citadas, por exemplo, o desenvolvimento de estudos envolvendo a função testicular; investigação dos efeitos de drogas, toxinas e contraceptivos na espermatogênese; estudo da regulação hormonal da espermatogênese e do desenvolvimento das células germinativas; introdução de vetores virais e não virais com a finalidade de se investigar a regulação genética da espermatogênese; a produção de espermatozóides transgênicos que podem ser utilizados na produção *in vitro* de embriões; conservação do plasma germinal de espécies ameaçadas de extinção e de animais com alto potencial zootécnico; e a produção de espermatozóides de animais clonados, mutantes e transgênicos apresentando alterações letais que causam morte ao nascimento. Neste último caso, mostrando a real aplicabilidade desta nova metodologia, trabalho recente mostrou que é possível gerar progênie normal a partir de injeção intracitoplasmática de espermatozóides obtidos do transplante de fragmentos de testículos de camundongos clonados que morreram logo após o nascimento (Ohta & Wakayama, 2005).

Particularmente em teleósteos, a utilização de transplante singênico (intra-específico) ou xenogênico (interespecífico) de espermatogônias tronco está criando um cenário totalmente novo e promissor na área de biotecnologia e produção em aquicultura. Possibilitando, ainda, a preservação de espécies em perigo de extinção e estudos envolvendo a biologia da reprodução e os mecanismos de regulação da gametogênese nesta

importante classe de vertebrados (Lacerda et al., 2006; Okutsu et al., 2006b; Schulz et al., 2010; Yazawa et al., 2010).

## **2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

Conforme já mencionado, até o presente momento, o transplante de espermatogônias é a única abordagem experimental funcional disponível para se investigar a biologia das espermatogônias-tronco. Além disso, esta técnica tem sido largamente utilizada na última década em mamíferos, com a finalidade de se estudar a espermatogênese em si, as interações entre células de Sertoli e células germinativas, apresentando ainda alto potencial para pesquisas no campo da agropecuária, preservação de espécies ameaçadas de extinção e de animais valiosos do ponto de vista zootécnico, medicina reprodutiva, produção de animais transgênicos, dentre outras. Em peixes teleósteos, esta técnica foi desenvolvida recentemente, utilizando-se a tilápia-nilótica como modelo experimental. Assim, todas as abordagens necessárias para o transplante de espermatogônias em machos sexualmente maduros foram padronizadas (Lacerda et al., 2006). Nestes estudos, os peixes receptores tiveram inicialmente sua espermatogênese endógena suprimida com tratamento com busulfan associado à temperatura de 35°C. Posteriormente, testículos de tilápias adultas foram digeridos com enzimas específicas (colagenase, tripsina e DNase). As células obtidas após a digestão foram centrifugadas em gradiente de Percoll, de onde se obteve um pool de espermatogônias que foram marcadas com o corante fluorescente PKH26. Estas células foram injetadas em machos adultos de tilápia, através do ducto espermático comum que se abre na papila urogenital, utilizando-se técnica especificamente desenvolvida para tal finalidade. Os peixes analisados 15 minutos e 14 horas pós-transplante apresentavam células transplantadas marcadas com PKH26, tanto no ducto espermático como no lume dos túbulos seminíferos (Lacerda et al., 2006). Estes resultados inéditos obtidos, com a utilização de protocolos inteiramente padronizados no Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG, mostraram que células germinativas podem ser transplantadas com sucesso diretamente nos testículo de peixes adultos. Desta forma, dando continuidade a esse estudo pioneiro, o presente trabalho tem como principais objetivos investigar:

a) A possibilidade de otimização dos protocolos de seleção de espermatogônias iniciais e marcação destas células com o corante PKH26;

b) a presença de cistos espermatogênicos exógenos marcados com PKH26, no período de uma a nove semanas após o transplante singênico de espermatogônias, através de microscopia de fluorescência;

c) a funcionalidade dos espermatozoides produzidos a partir de espermatogônias dos doadores, através do cruzamento de machos de tilápias transplantados com fêmeas selvagens e caracterização molecular da progênie por meio de DNA microsatélite;

d) a viabilidade das tilápias-nilóticas como modelo receptor para o transplante xenogênico de espermatogônias de outra espécie de teleosteo de importância econômica (Tucunaré, *Cichla monoculus*);

e) a viabilidade das tilápias-nilóticas como modelo receptor para o transplante de células germinativas provenientes de espécies de vertebrados pertencentes a diferentes classes (Rã-touro, *Lithobates catesbeianus* e Rato, *Rattus norvegicus*);

f) a viabilidade do transplante de espermatogônias singênico em tilápias, após estas células terem sido criopreservadas;

g) a expressão de possíveis marcadores moleculares de espermatogônias-tronco (e.g. receptor Notch1) nos testículos de tilápias-nilóticas adultas através de imunohistoquímica.

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- ANIMAIS**

As tilápias-nilóticas da variedade tailandesa ou chitralada (*O. niloticus*) utilizadas no presente trabalho foram cedidas pela Estação de Aqüicultura Geneforte, Pedro Leopoldo, MG e pelo Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária da UFMG (Laqua). Estes animais, trazidos para o laboratório, jovens e sexualmente maduros, foram mantidos em aquários plásticos contendo 250 litros de água, à temperatura de 25°C, sob fotoperíodo de 12-14 horas diárias e alimentados *ad libitum* com ração comercial para peixes. Como procedimentos auxiliares na manutenção da qualidade da água, aeradores e filtros biológicos foram utilizados. As tilápias da variedade Ceará (genericamente chamadas de tilápias vermelhas), os tucunarés (*Cichla monoclus*) e as rãs-touro (*Lithobates catesbeiana*) aqui utilizados, também jovens sexualmente maduros foram provenientes de criatórios comerciais. Neste estudo, também foram utilizados ratos Wistar sexualmente imaturos (9-10 dias de idade) procedentes do biotério do ICB/UFMG. Já os ratos Wistar transgênicos, expressando EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) sob o controle do promotor da ubiquitina-C humana, usados no presente trabalho, foram cedidos pelo professor Alfredo Miranda de Góes (Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB/UFMG) e procedentes do “The Rat Resource and Research Center”, Missouri, EUA.

Antes de se iniciar qualquer etapa desse estudo que requeria manipulação efetiva dos animais, os mesmos foram previamente anestesiados, utilizando-se de protocolo adequado. Desta forma, as rãs e os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg) e os peixes com quinaldina (Merck & Co.), dissolvida em água na proporção de 0,5ml/L, por aproximadamente 5 minutos. Todos os experimentos desenvolvidos no presente estudo foram conduzidos de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG; protocolo nº 071/05).

#### **3.2 - DEPLEÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE ENDÓGENA DOS ANIMAIS RECEPTORES**



O protocolo utilizado para promover a depleção da espermatogênese endógena de tilápias adultas foi baseado em estudos previamente desenvolvidos no Laboratório de Biologia Celular (Silva et al., 2004; Lacerda et. al, 2006). Desta forma, todas as tilápias machos receptores sexualmente maduros, mantidos à temperatura de 35°C, foram tratados com duas injeções (18 mg/kg/peso corporal e 15mg/kg/peso corporal), por via intracelomática, da droga quimioterápica busulfan (Sigma, MO, USA), com intervalo de duas semanas entre as mesmas.

Merece ser ressaltado que após o período de adaptação, de cerca de três semanas, a temperatura da água da caixa dos animais receptores foi aumentada gradativamente, com a utilização de aquecedores e termostatos, durante uma semana, até atingir 35°C. As tilápias foram mantidas nesta temperatura por aproximadamente uma semana antes de receber o tratamento com busulfan. Por ser uma substância hidrofóbica, antes de ser injetado o busulfan foi diluído inicialmente em dimetil sulfóxido (DMSO, Merck & Co.) e, posteriormente, em água destilada sob agitação constante a 35°C.

### **3.3 - OBTENÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS DOS ANIMAIS DOADORES**

#### **3.3.1 - Dissociação enzimática dos testículos de tilápias, tucunarés e rãs.**

Após serem anestesiadas e em seguida sacrificadas, as tilápias (variedade chitralada n= 38; variedade Ceará n=15), rãs (n= 12) e tucunarés (n= 4) foram pesados e aspergidos em álcool a 70%, com a finalidade de facilitar a realização dos procedimentos necessários em condições mais assépticas. Assim, os testículos foram coletados cuidadosamente em capela de fluxo laminar e lavados em solução salina balanceada de Hanks (HBSS: NaCl 0,137M; KCl 5,4mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44mM; NaHCO<sub>3</sub> 4,2mM; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5,5mM) contendo 0,1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (10000U.I./10mg/mL, Sigma). Estes testículos foram pesados, cortados em pequenos fragmentos (~2mm<sup>3</sup>) e lavados por várias vezes (até cinco vezes) em HBSS, a fim de se retirar o eventual excesso de sêmen e sangue. A seguir, preparou-se uma solução de colagenase (Tipo IA, Sigma) em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle medium/Ham F-12 medium 1:1 (DMEM/F12 Gibco, Grand Island, NY) na concentração 2mg/mL, onde os fragmentos foram imersos e incubados sob leve agitação por 1 hora à 25°C. Posteriormente, adicionou-se 20µg/mL de DNase I (Sigma) para diminuir a viscosidade do meio e facilitar a dispersão das células que foram incubadas por mais 3 horas,

sob leve agitação. Alguns pequenos fragmentos testiculares que ainda eram observados após a incubação foram dissociados mecanicamente com auxílio de uma pipeta (~1mm de diâmetro). Subseqüentemente, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 100g. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em solução de Tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma). Após 30 minutos sob leve agitação, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB- Gibco). DNase I (20µg/mL) foi novamente adicionada à suspensão celular facilitando assim o processo de filtragem da mesma que foi realizado em peneira (Sigma) com poros de aproximadamente 60µm. O filtrado assim obtido foi centrifugado por 10 minutos à 100g. Após retirada cuidadosa do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em DMEM/F12 suplementado com 0,75% (p/v) de Albumina de Soro Bovino (BSA, Sigma).

### **3.3.2 - Dissociação enzimática dos testículos de ratos**

As células germinativas de ratos foram isoladas seguindo-se protocolo descrito por Zhang e colaboradores (2003) com modificações. Assim, após serem anestesiados, os ratos wistar (n= 20) e os ratos transgênicos GFP (n=4) foram pesados e aspergidos em álcool a 70% mais iodo. Os testículos foram coletados cuidadosamente e lavados em HBSS adicionado com 0,1% de antibiótico. Estes testículos foram pesados, descapsulados e lavados várias vezes em HBSS. A seguir, os testículos foram imersos em solução de colagenase (2mg/mL de DMEM/F12) e incubados sob leve agitação (70 agitações por minuto), durante de 20 minutos à 35°C. Após esse procedimento, o material foi deixado em repouso no gelo e o sobrenadante, contendo células do interstício, foi descartado e o material lavado posteriormente em HBSS. Os túbulos seminíferos foram colocados num segundo meio de digestão contendo colagenase e hialuronidase (ambos 2mg/mL de DMEM/F12 pH 7,3), ao qual foi adicionado 50 µg/mL de DNase I (Sigma) para facilitar a dispersão dos túbulos que foram incubadas por 30 minutos, sob leve agitação à 35°C. Após esse período, os túbulos seminíferos foram deixados em repouso por 2 minutos e o sobrenadante descartado, sendo o material lavado novamente em HBSS, deixado em repouso no gelo e o sobrenadante descartado. Este procedimento teve como finalidade retirar todas as células intersticiais, permanecendo no meio somente os túbulos seminíferos com as células peritubulares mióides. Em seguida, estes túbulos foram incubados em tripsina-EDTA (0,25%) por 15 minutos no agitador, na temperatura de 35°C, tendo sido adicionado 100 µg/mL de DNase à

solução para facilitar a dispersão das células. Após esse período, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 10% (v/v) de SFB. Nesta etapa, foi efetuada agitação mecânica, com o auxílio de pipeta para efetivar a separação das células, sendo adicionado 20 µg/mL de DNase para desfazer grandes agregados celulares. Em seguida, a solução celular foi filtrada em peneira (Sigma) com poros de aproximadamente 60µm. O filtrado assim obtido foi centrifugado por 10 minutos à 100g. Depois da retirada cuidadosa do sobrenadante, as células foram ressuspensas em DMEM/F12-BSA (0,75%) sendo este procedimento repetido.

### **3.3.3 - Separação por gradiente de Percoll, plaqueamento diferencial por adesão e seleção das células germinativas**

Portanto, no presente trabalho, as células obtidas a partir da dissociação e digestão enzimática dos testículos foram fracionadas, através de gradiente descontínuo de densidade utilizando-se Percoll (Sigma), com o objetivo de se obter maior concentração de espermatogônias na suspensão a ser transplantada. Os procedimentos de separação, seleção e avaliação das células germinativas foram similares para todas as espécies doadoras utilizadas.

Seguindo as normas do fabricante, antes de ser utilizado, a osmolaridade do Percoll foi ajustada adicionando-se uma parte do diluente presente no kit comercial para cada nove (1:9) de Percoll, solução esta denominada Percoll 100%. A partir desta solução e utilizando-se DMEM/F12-BSA foram preparadas quatro diferentes concentrações para preparação do gradiente a ser utilizado; Percoll 10%, 25%, 30% e 40%. Estas soluções em diferentes concentrações foram cuidadosamente e seqüencialmente (de 40% para 10%) colocadas num tubo cônico (Falcon 15ml). Finalmente, a suspensão de células foi depositada no topo da coluna de Percoll, e centrifugada por 30 minutos (800g) a 25°C. Devido à diferença de densidade, com este procedimento as células concentram-se nas diferentes interfaces das soluções de Percoll, formando bandas visíveis, nas quais as células alvo de nosso interesse (espermatogônias imaturas) podem ser visualizadas em microscópio e selecionadas pelo seu maior tamanho. Com base em características morfológicas das células, as duas bandas superiores formadas foram selecionadas para o transplante por apresentarem maior concentração de espermatogônias conforme protocolos previamente padronizados (Lacerda et al., 2006).

Após as células serem coletadas e lavadas, as mesmas foram colocadas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e cultivadas por 12 horas, procedimento este denominado de plaqueamento diferencial por adesão. Segundo a literatura (Luo et al., 2006; Shikina et al., 2008), após esse curto tempo de cultivo, as células somáticas tem a capacidade de se aderirem à placa de cultura enquanto as células germinativas permanecem suspensas no sobrenadante, ou fracamente aderidas às células somáticas. Dessa forma, as células selecionadas foram quantificadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de cultivo (100 x 20 mm) na concentração de  $10^7$  por placa e mantidas em cultura a 25°C (células de tilápias, tucunaré e rãs) ou 35°C (células de rato) em 5% de CO<sub>2</sub>, por aproximadamente 12-15 horas. Após esse período, as placas contendo as células foram analisadas com o auxílio de microscópio de luz invertido. O sobrenadante contendo as células livres foi coletado e as células frouxamente aderidas às células somáticas foram desprendidas utilizando-se solução de tripsina a 0,25%/EDTA em DPBS (Dulbecco's PBS sem cálcio e magnésio) na diluição de 1:10. À medida que as células se soltavam era adicionado SFB para neutralizar a ação da tripsina e as células eram coletadas. Na seqüência, as células foram contadas e a viabilidade das mesmas foi verificada através do método de exclusão por azul de tripan.

### **3.4 – MARCAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS DOS DOADORES**

Após o transplante, para que as células germinativas dos doadores possam ser identificadas e investigadas nos túbulos seminíferos dos testículos dos animais receptores, é necessário que as mesmas sejam reconhecidas de maneira inequívoca. Conforme já comentado, características morfológicas peculiares dos espermatozoides, o *LacZ*, a proteína fluorescente verde (GFP) e o PKH26 são os marcadores mais utilizados para se monitorar a presença de células germinativas transplantadas. No caso específico do presente trabalho, pelo fato da marcação celular permanecer mesmo após as células terem sofrido sucessivas divisões, o corante fluorescente PKH26GL (*Red Fluorescent Cell Linker* - Sigma) foi por nós considerado o marcador mais conveniente. Com exceção das células germinativas isoladas dos testículos das tilápias vermelhas, ratos transgênicos GFP e de ratos wistar, todos os outros grupos de animais utilizados como doadores tiveram as células germinativas marcadas com PKH26.

Com o objetivo de se otimizar o protocolo de marcação das células germinativas de tilápias-nilóticas com PKH26 (previamente padronizado na concentração de 16 $\mu$ M, Lacerda, 2006), a viabilidade das células selecionadas e marcadas com três novas concentrações (13 $\mu$ M, 18 $\mu$ M e 26 $\mu$ M) foi avaliada através do corante vital azul de tripan nos períodos imediatamente após a marcação celular, ou seja, 12, 24 e 48 horas em cultura após esta marcação. Foi utilizado um total de 10<sup>7</sup> células para cada concentração. Para verificar a intensidade de fluorescência e o total de células marcadas com a concentração mais viável obtida no experimento acima, alíquotas de células não marcadas e marcadas com PKH26 foram quantificadas em citômetro de fluxo FACScan, (Becton Dickinson) logo após a marcação, com aquisição de 20.000 eventos por amostra através do detector de fluorescência FL2.

Para a marcação das células germinativas isoladas de rãs e tucunarés utilizou-se a mesma concentração de PKH26 padronizada para o transplante singênico em tilápias-nilóticas. Assim, as células selecionadas foram lavadas novamente em DMEM/F12 (sem soro ou BSA) por 10 minutos a 400g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente de forma que uma quantidade mínima de meio de cultura permanecesse sobre o pellet. Em seguida, as células germinativas selecionadas foram quantificadas. Para cada dez milhões (10<sup>7</sup>) de células foi acrescentado 1mL do Diluente C (solução aquosa iso-osmótica livre de Ca<sup>2+</sup> ou outros sais fisiológicos, Sigma) onde o pellet foi ressuspendido até a sua completa dispersão. Em seguida, preparou-se o mesmo volume de solução corante diluindo-se a solução estoque de PKH26 (1mM em etanol, Sigma) em Diluente C. A solução corante foi adicionada rapidamente à suspensão celular de forma homogênea e sob leve agitação. Esta mistura, assim obtida, foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. A reação foi interrompida após 10 minutos através da adição de volume igual de SFB, por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se a esta suspensão volume igual de DMEM/F12-BSA. Logo após, as células marcadas com PKH26 foram centrifugadas por 10 minutos a 400g, com a finalidade de separá-las da solução acima citada. Este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas, estando as células aptas a serem transplantadas após estes procedimentos.

### **3.5-TRANSPLANTE DE CÉLULAS GERMINATIVAS E ANÁLISE DOS TESTÍCULOS TRANSPLANTADOS**

Devido às diferenças anatômicas do trato genital masculino, as vias de transplante utilizadas usualmente para mamíferos (túbulos seminíferos, rete testis e dúctulos eferentes (Ogawa et al., 1997) não podem ser extrapoladas para teleósteos. Portanto, a única via não cirúrgica que permite o acesso aos túbulos seminíferos em tilápias adultas é através do poro urogenital localizado na papila urogenital. Assim, de acordo com procedimentos previamente padronizados, na terceira semana após o tratamento com a primeira dose de busulfan, tilápias com a espermatogênese endógena depletada receberam o transplante de células germinativas através da papila urogenital, com o auxílio de microscópio estereoscópico Olympus SZX-ILLB2-100, utilizando-se micropipeta com aproximadamente 70µm de diâmetro externo em sua extremidade, acoplada a seringa de 1mL. Cada animal recebeu 1mL de suspensão celular contendo as células germinativas na concentração de 10<sup>7</sup> células/mL. Esta suspensão era também constituída de corante vital azul de tripan 0,4% em salina (Sigma) e DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, na proporção de 1:10. Por destacar os túbulos seminíferos de forma bastante evidente, neste caso específico o azul de tripan foi utilizado com a finalidade de se avaliar a eficiência da injeção de células germinativas nos testículos. Após o transplante, a temperatura da água das caixas onde os peixes receptores permaneceram foi gradativamente diminuída durante uma semana (1-2°C por dia), até atingir 25°C.

### 3.5.1- Transplante Singênico

**Tilápia-nilótica para Tilápia-nilótica:** Quarenta tilápias machos adultas receberam as células germinativas dos doadores marcadas com PKH26. Estas tilápias foram sacrificadas e tiveram seus testículos coletados em diferentes períodos após o transplante conforme mostrado no quadro abaixo.

	Período após o transplante (horas e semanas)									
	1h	14hs	2 sm	3sm	4sm	5 sm	6 sm	7 sm	8 sm	9 sm
<b>Nº de animais analisados</b>	4	2	4	3	5	5	6	5	3	3

**Tilápia-nilótica (Ceará) para Tilápia-nilótica (Chitralada):** Quatro tilápias adultas da linhagem chitralada receberam as células germinativas dos doadores (n=14, linhagem vermelha ou Ceará) e 9 semanas após o transplante os machos receptores foram mantidos

com fêmeas da mesma linhagem (n=4) em hapas de reprodução. Os ovos foram coletados das fêmeas durante a incubação oral e colocados em incubadoras artificiais até a fase de eclosão. As larvas obtida desse cruzamento foi caracterizada geneticamente, através de marcadores de microsátélites, com a finalidade de se detectar nesses indivíduos a presença de alelos específicos da linhagem doadora, conforme será descrito mais adiante.

### **3.5.2- Transplante xenogênico**

***Tucunaré para Tilápia-nilótica*** Com o objetivo de se avaliar a viabilidade do transplante de células germinativas entre diferentes espécies de teleósteos foram utilizadas duas espécies de peixes filogeneticamente próximas. Nesse sentido, escolheu-se o tucunaré-amarelo (*Cichla monoculus*) como doador de células germinativas pois, à semelhança da tilápia-nilótica esse teleósteo também pertence a família Cichlidae, apresenta espermatogênese cística e se reproduz em torno de 25°C. Como informações adicionais, o tucunaré atinge a maturidade sexual entre 12 e 18 meses, é um peixe muito apreciado na pesca esportiva, e sua carne apresenta muito boa aceitação (Shafland, 1996; Gomiero & Braga, 2003).

Três tilápias machos adultos receberam as células germinativas de tucunaré marcadas com PKH26. Estas tilápias foram sacrificadas e tiveram seus testículos coletados com 2 semanas (2 animais) e 4 semanas (1 animal) após o transplante, os quais foram posteriormente analisados através de microscopia de fluorescência.

***Rã-touro para Tilápia-nilótica:*** À semelhança das tilápias, a rã-touro apresenta espermatogênese com arranjo do tipo cística (Pudney, 1995, Segatelli et al, 2009). Esta característica comum aos peixes teleósteos e aos anfíbios em tese é favorável quando se busca maior grau de compatibilidade entre as células germinativas do doador e as células de Sertoli do receptor. Além de possuir importância comercial, a rã-touro também apresenta fácil disponibilidade no mercado, facilidade de manutenção em condições de laboratório (Vieira, 1993). Ainda, o fato de se reproduzirem na temperatura média de 25°C (como a tilápia) faz deste anfíbio um modelo bastante atraente para se estudar a viabilidade do transplante de células germinativas entre estas duas diferentes espécies de vertebrados. Desta forma, nove tilápias machos adultos receberam as células germinativas de rãs (n=12) marcadas com PKH26. Estes peixes foram sacrificados e tiveram seus testículos coletados em

diferentes períodos após o transplante conforme mostrado no quadro abaixo. Para a análise desse material foi utilizado microscópio de fluorescência.

	Período após o transplante (semanas)						
	1 sm	2 sm	3 sm	4 sm	6 sm	7 sm	8 sm
Nº de animais analisados	1	1	1	2	2	1	1

**Rato para *Tilápia nilótica*:** Além dos transplantes xenogênicos acima descritos, avaliou-se a plasticidade dos testículos de tilápias investigando-se a viabilidade dos mesmos como receptores de células germinativas de rato. Diferentemente dos teleósteos que possuem arranjo cístico da espermatogênese, os mamíferos apresentam arranjo segmentar, organizado em estádios, onde as células de Sertoli estão em contato direto com todas as células da linhagem germinativa.

Quatro tilápias machos adultos receberam células germinativas de ratos Wistar. Estes teleósteos foram sacrificados com 2 e 5 semanas após o transplante. Dois animais foram utilizados para cada tempo. Células germinativas isoladas de ratos GFP transgênicos adultos foram também transplantadas nos testículos de duas tilápias as quais foram sacrificadas 8 semanas pós transplante.

### **3.5.3- Processamento das amostras para análise em microscopia de fluorescência e convencional**

Imediatamente após a coleta, fragmentos dos testículos transplantados foram embebidos em meio apropriado (Jung Tissue Freezing Medium; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha), congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados à -80°C. Estes fragmentos foram seccionados de forma seriada na espessura de 5µm, utilizando-se criostato à -30°C (LEICA CM 1850; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha). Os cortes obtidos foram secos em geladeira, corados com DAPI ou Iodeto de Propídio (no caso dos cortes contendo células GFP positivas) e montadas em Mowiol (Merck). Para a análise histológica foi utilizado o microscópio (Olympus IX-70) de fluorescência com filtros U-MWIY (para PKH26 e iodeto de propídio), U-MNV (para DAPI) e U-MSWB (para GFP) da Olympus. A documentação fotográfica foi feita utilizando-se câmera digital acoplada ao microscópio.

Pelo fato das células germinativas de rato apresentarem características morfológicas peculiares, bastante diferentes das células de tilápia, as análises dos testículos dos peixes que



receberam células de ratos selvagens foram feitas utilizando microscópio de luz convencional. Assim, os fragmentos de testículos dessas tilápias receptoras foram fixados por imersão em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,05M (pH 7,3), por 24 horas a 4°C. Este material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), com trocas a cada 30 minutos, sendo posteriormente incluído em resina plástica (glicol metacrilato, GMA; Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instruments) de acordo com técnicas de rotina do Laboratório de Biologia Celular, ICB-UFMG. Após esta etapa, o material foi seccionado serialmente com navalhas de vidro em micrótomo JB-4 Sorvall. Estas secções com espessura de 4µm foram colocadas em lâminas histológicas e coradas com azul de toluidina + borato de sódio a 1%, sendo posteriormente montadas com Entellan (Merck). Para a análise morfológica e documentação fotográfica utilizou-se o fotomicroscópio BX-60 Olympus, equipado com câmera fotográfica digital C-7070 Olympus .

### **3.6 - ANÁLISE DE DNA MICROSATÉLITE DE TILÁPIAS-NILÓTICAS**

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores microsátélites são os que possuem o mais elevado grau de informação de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Frente a tais vantajosas características, esses marcadores têm se mostrado como valiosa ferramenta em estudos com peixes, envolvendo o mapeamento genético e o teste de paternidade (Sakamoto et al, 2000; Sprecher et al, 1996), além de serem amplamente utilizados em estudos populacionais (Hatanaka et al, 1996). Desta forma, no transplante singênico realizado entre as duas diferentes linhagens de tilápias já citadas, para confirmar geneticamente de forma indireta que pelo menos parte dos espermatozoides produzidos pelas tilápias receptoras eram provenientes de espermatogônias transplantadas, e também que esses espermatozoides eram viáveis, a análise de DNA microsátélite nos indivíduos da progênie resultantes do cruzamento dos machos transplantados com fêmeas chitraladas foi realizada. Esta análise será descrita em maiores detalhes a seguir.

#### **3.6.1- Extração do DNA genômico**

O DNA de cada indivíduo (animais doadores n=15, receptores n=6, fêmeas n=8 e alevinos da progênie n=32) foi extraído a partir de pequenos pedaços (aproximadamente

250 mm<sup>2</sup>) de nadadeira, através do método Chelex-proteinase K. As amostras foram colocadas em tubos tipo eppendorfs, cada um com 200µl de tampão contendo 5% de resina chelex e 0,1% de Tween-20. Em seguida, foram adicionados 2µl de Proteinase K (10mg/ml) e os tubos foram levados ao termociclador onde foram aquecidos a 60°C por 15 minutos e a 95°C por 5 minutos. Após estas etapas, as amostras foram incubadas em freezer a -20°C até o dia seguinte. Esse método foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Nelson e colaboradores (1998) e possibilitou a extração de DNA de grande número de indivíduos de maneira rápida, direta e relativamente barata.

### **3.6.2- PCR e eletroforese**

Foram amplificados cinco loci de microsátélites em cada um dos indivíduos analisados: UNH104, UNH108, G12288, G12312 e G12321 (Genebank). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas no termociclador PTC-100 *Programable Thermal Controller* (MJ Research). Todas as reações apresentaram um volume final de 25µL, contendo 1µL (5pmol/µL) de cada iniciador, 1µL (1mM) de deoxirribonucleotídeos trifosfatados, 5µL de tampão IVB 5X (*Phonutria*) e 0,2µL (500U/µL) de Taq DNA polimerase (*Phonutria*), 75ng de DNA molde e água deionizada estéril (q.s.p. 25µL). Os ciclos de temperaturas foram precedidos por incubação de desnaturação de 3 minutos a 95°. Os ciclos de amplificação foram de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 35 segundos a 50°C (anelamento) e 30 segundos a 72°C (extensão), por 5 ciclos seguidos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 35 segundos a 48°C (anelamento) e 30 segundos a 72°C (extensão), por 25 ciclos, quando as amostras foram então resfriadas a 4°C.

Os alelos dos microsátélites foram fracionados por tamanho, em géis de poliacrilamida a 6% contendo uma proporção de 19:1 de acrilamida para bis-acrilamida. Os géis foram colocados em cubas verticais contendo TBE 1X e submetidos a um campo elétrico de 100V, por 15 horas. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata e em seguida foram digitalizados. Cada gel incluiu duas canaletas com marcador de 25 pares de base (pb) (DNA Ladder- Invitrogen) para criar padrão de tamanho molecular através da qual foram estimados os tamanhos dos alelos de microsátélites amplificados. Os alelos obtidos foram analisados através do software Diversity Database (Bio-Rad).

### **3.7- CRIOPRESERVAÇÕES DE ESPERMATOGÔNIAS DE TILÁPIA-NILÓTICA**

Testículos de 20 tilápias sexualmente maduras foram coletados, digeridos enzimaticamente (colagenase e tripsina) e uma suspensão celular enriquecida de espermatogônias foi obtida de acordo com procedimentos já descritos anteriormente (item 3.4). Essas células foram quantificadas e a viabilidade antes do congelamento foi determinada pelo método de exclusão por azul de tripan. Protocolos de criopreservação de células germinativas anteriormente descritos (Avarbock et al., 1996; Kobayashi et al., 2006) foram adaptados e padronizados de acordo com os nossos objetivos, conforme segue abaixo.

Alíquotas de 500µL da suspensão celular na concentração de  $10^6$  células/mL foram distribuídas em criotubos de 1,5mL (TPP). A essas alíquotas foi acrescido do mesmo volume de meio crioprotetor resfriado: *DMSO 20% + SFB 20% + DMEM/F12 60%* (Avarbock et al., 1996) ou *Etilenoglicol 10% + D-glicose 0,09% + 0,5% BSA em PBS* (Kobayashi et al., 2006) sob agitação manual constante. Como controle, em algumas amostras acrescentou-se somente DMEM/F-12. Todo esse processo foi realizado em banho de gelo ( $\sim 4^\circ\text{C}$ ) para a manutenção da baixa temperatura, evitando-se o efeito tóxico do DMSO e do etilenoglicol. As células germinativas foram congeladas a uma taxa de resfriamento controlado (programado) ou não controlado. No congelamento não controlado, os criotubos contendo as células germinativas de tilápia foram mantidos em gelo por 15 minutos, transferidos para freezer  $-80^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por 12 horas. Em seguida, os mesmos foram imersos em nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ), onde permaneceram estocados até o momento de uso. Para o congelamento controlado foi utilizado freezer programável (TermoForma modelo 7450) da Unidade de Criopreservação Criovida - Instituto Hermes Pardini. A taxa de resfriamento foi programada (de acordo com protocolos utilizados para congelamento de células do cordão umbilical) até atingir  $-80^\circ\text{C}$ , conforme mostrado na Figura 5 abaixo. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o nitrogênio líquido. Após três semanas, o descongelamento das amostras foi realizado a  $25^\circ\text{C}$  em banho-maria por 3-4 minutos, em seguida, as células foram lavadas em DMEM/F12 e o agente crioprotetor foi removido. A viabilidade celular de todas as amostras foi avaliada através do teste de exclusão por azul tripan em câmara de Neubauer.

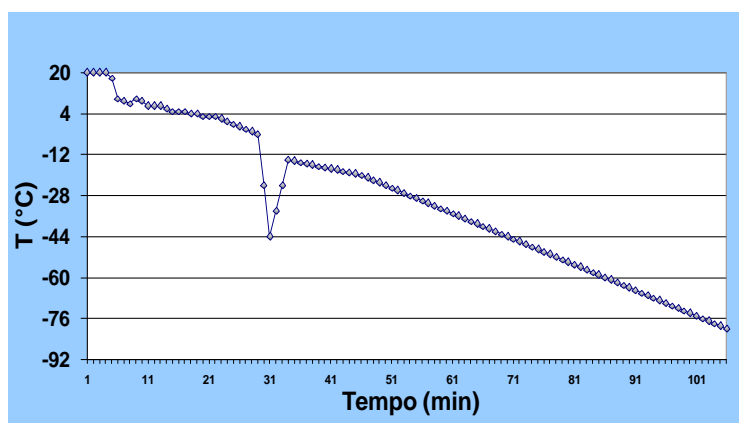


Figura 5. Curva de congelamento controlado. Etapas do processo: Estabilização da temperatura da câmara e das amostras em 4°C. Redução da temperatura a 1°C/min até -4°C. Redução brusca de temperatura a 20°C/min até -45°C seguida de uma elevação a 10°C/min at -10°C. Redução constante da temperatura de 0,5°C/min até -20°C. Redução constante da temperatura de 1°C/min até a temperatura final de -80°C.

A partir dos resultados obtidos no experimento acima descrito, as amostras celulares que apresentaram maior taxa de sobrevivência celular após o descongelamento foram mantidas em cultura por 48 horas (DMEM/F12, 10% de SFB, 5% de CO<sub>2</sub>) na presença de timidina triada (thymidine (methyl-3H) Amersham, Life Science, Buckinghamshire, England), na concentração de 1µC/ml, para se investigar a capacidade proliferativa (síntese de DNA) dessas células germinativas após o processo de criopreservação. Após esta etapa, pellets celulares foram obtidos, incluídos em ágar a 3% e fixados em glutaraldeído tamponado a 4% por duas a quatro horas, a 4°C. Os mesmos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, os pellets foram incluídos em GMA (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instruments), sendo posteriormente seccionados na espessura de 4µm em micrótomo com navalhas de vidro.

As secções histológicas obtidas foram submetidas ao processo de emulsão em câmara escura. Assim, as lâminas com os cortes foram mergulhadas em cubetas contendo emulsão rádio-autográfica Kodak NTB-2 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA), mantida líquida em banho-maria a 45°C. Após cerca de 1 hora, ainda em câmara escura e à temperatura ambiente, os cortes já secos foram acondicionados em caixas de lâminas à prova de luz e armazenados a 4°C, durante 28 dias. Este período foi suficiente para que o rádioisótopo sensibilizasse os grãos de prata da emulsão.

Após os tempos citados, procedeu-se à revelação das secções histológicas em câmara escura utilizando-se solução aquosa (1:1) do revelador Kodak D-19, por 4 minutos, de acordo com Bundy (1995). Os cortes foram então lavados por alguns segundos em água destilada e fixados em fixador Kodak F5, por 5 minutos. Após serem imersas por cinco minutos em água destilada para retirada do fixador, as lâminas contendo os cortes foram secas à temperatura

ambiente, sendo então corados com azul de toluidina. Todas as etapas desenvolvidas na câmara escura (revelação, banhos em água destilada e fixação) foram realizadas à temperatura de aproximadamente 15°C. A análise das células marcadas foi feita em microscópio Olympus do Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG, em aumento de 400x.

Dando sequência a essa investigação, posteriormente novas alíquotas de células germinativas foram obtidas, congeladas, descongeladas após três semanas e finalmente transplantadas no testículo de tilápias adultas previamente tratadas com busulfan. Oito machos receberam as células germinativas criopreservadas marcadas com PKH26. Estas tilápias foram sacrificadas e tiveram seus testículos coletados em diferentes períodos após o transplante, conforme mostrado no quadro abaixo.

<b>Período após o transplante (semanas)</b>					
	<i>4 sm</i>	<i>8 sm</i>	<i>9 sm</i>	<i>10 sm</i>	<i>11 sm</i>
<b>Nº de animais analisados</b>	1	2	1	2	2

### **3.8- IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O RECEPTOR NOTCH-1**

Para as reações de imunohistoquímica, testículos de tilápias-nilóticas adultas (n=5) foram coletados, fixados em formalina tamponada neutra (FTN) por 12 horas à 4°C e incluídas em Paraplast (Sigma-Aldrich). As secções histológicas obtidas com de 5 µm de espessura, foram aderidas em lâminas tratadas com poli-L-lisina, desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol e água destilada. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da incubação dos cortes com “Dual Endogenous Enzyme Block” (Dako Envision), por 30 minutos. A recuperação antigênica foi feita utilizando-se tampão citrato (pH 6,0) em forno microondas, com potência máxima, por quinze minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com soro normal de cabra à 10% (30 minutos) e em seguida com o anticorpo primário *overnight* à 4°C. Utilizou-se o anticorpo policlonal anti-Notch Homolog 1 (LS-C47387 - LifeSpan BioSciences), na diluição 1:100, em PBS/BSA 1%. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado e o complexo estreptavidina- peroxidase (Peroxidase Dual Link System- Dako Envision), por 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi revelada com

diaminobenzidina (DAB) e os cortes contracorados com Hematoxilina de Mayer. Como controle positivo foram utilizadas secções histológicas de testículos de rato adulto e como controle negativo, em algumas secções de testículos de tilápia o anticorpo primário foi substituído por PBS (omissão do anticorpo primário).

## **4 – RESULTADOS**

### **4.1- OBTENÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS PARA O TRANSPLANTE**

Conforme já mencionado, o protocolo utilizados no presente trabalho para seleção de espermatogônias através de plaqueamento diferencial por adesão foram adaptações daqueles previamente descritos na literatura (Luo et al., 2006; Shikina et al., 2008) para outras espécies. Os resultados obtidos a partir deste protocolo sugerem que o mesmo foi bastante eficiente. Mesmo após enriquecimento prévio através de centrifugação em gradiente de percoll, eventuais células somáticas (células de Sertoli, peritubulares mióides e de Leydig) ainda estavam presentes nesse *pool* de células selecionadas. Da mesma forma, conforme já descrito para outras espécies, após o cultivo por um curto período de tempo (12 horas), as células somáticas do testículo de tilápia têm a capacidade de se aderirem à placa de cultura (Fig. 1). Desta forma, coletando as células livres, conseguimos enriquecer ainda mais a suspensão celular a ser transplantada com os tipos celulares desejados, ou seja, espermatogônias com características de células mais imaturas. É importante ressaltar que ainda não existe nenhum tipo de marcador molecular específico para espermatogônias-tronco em peixes, e principalmente em tilápias-nilóticas (Takeuchi et al., 2003; Schulz et al., 2010). No entanto, pelo fato das características morfológicas das espermatogônias-tronco serem muito semelhantes a das espermatogônias do tipo A, presentes em grande número nas duas camadas superiores da coluna de percoll (Lacerda et al., 2006), pode-se considerar que as mesmas encontravam-se no *pool* espermatogônias selecionadas (Fig. 1 e 3D). Essa característica de aderência das células somáticas testiculares à placa de cultivo também foi observada em tucunarés e ratos, o que também contribuiu para uma melhor seleção das células germinativas nos transplantes xenogênicos.

### **4.2 - MARCAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS DOS DOADORES.**

A utilização do corante fluorescente PKH26-GL propiciou eficiente marcação da membrana citoplasmática das células da linhagem espermatogênica de tilápia a serem

transplantadas. A Figura 2A mostra a viabilidade das células germinativas marcadas com as três diferentes concentrações (13  $\mu$ M, 18 $\mu$ M e 26 $\mu$ M) da solução corante de PKH26 testadas em diferentes períodos após essa marcação. Conforme pode ser observado nesta figura, imediatamente após a marcação celular o número de células viáveis foi maior para concentração de 13 $\mu$ M (71 %). A concentração de 18 $\mu$ M resultou numa viabilidade de 60%, enquanto a concentração de 26 $\mu$ M diminuiu bastante a viabilidade celular (25%). Após 12 horas de cultivo, observou-se que o número de células germinativas vivas aumentou em todos os grupos, sugerindo que para marcação com PKH26 não afetou a capacidade proliferativa dessas células e as maiores proliferações celulares foram observadas para as concentrações de 13 e 18 $\mu$ M. Na figura 2A também pode ser observado que, 24 e 48 horas após a marcação, o número de células vivas diminuiu em todos os grupos de células, provavelmente devido às condições gerais de cultivo tais como déficit nutricional, alteração do pH dentre outros. Ao se analisar essas células germinativas em microscopia de fluorescência, logo após a marcação, notou-se que o número de células PKH26 positivas era visivelmente maior para a concentração de 18 $\mu$ M, quando comparado com o grupo de células marcadas com 13 $\mu$ M. Esta observação nos levou a optar pela utilização da concentração de 18 $\mu$ M como protocolo viável de marcação de células germinativas a serem transplantadas. As análises realizadas através de citometria de fluxo mostraram que na população de células germinativas de tilápias selecionadas (Fig. 2B) 91,3% dessas células marcadas com a concentração de 18 $\mu$ M são PKH26 positivas (Fig. 2C). Além disso, a grande maioria dessas células apresentou alta intensidade de fluorescência.

Conforme será visto adiante, de maneira geral, a concentração de PKH26 que utilizamos para marcar as células germinativas das diferentes espécies estudadas foi eficiente para acompanharmos o transplante pelo período de tempo do estudo utilizado, que para alguns grupos se estendeu por até onze semanas após o transplante.

#### **4.3- INJEÇÃO DE ESPERMATOGÔNIAS DOS DOADORES NOS TESTÍCULOS DE TILÁPIAS TRATADAS COM BUSULFAN**

A depleção da espermatogênese endógena após o tratamento com busulfan e alta temperatura (35°C) foi efetiva nos testículos de animais receptores sacrificados no dia do transplante (Fig. 3A-B). Conforme pode ser observado, diferentemente do testículo controle



(Fig. 3A), onde a espermatogênese apresenta-se aparentemente normal com cistos espermatogênicos em diferentes fases do desenvolvimento, no testículo tratado com busulfan (Fig. 3B) os túbulos seminíferos estão desprovidos de células germinativas apresentando apenas células de Sertoli (SCO; *Sertoli cell- only*). No entanto, a luz destes túbulos apresentava um número apreciável de espermatozóides remanescentes da espermatogênese antes da mesma ser comprometida pelo tratamento.

Ainda na Figura 3, é possível observar a histologia do testículo de uma tilápia sexualmente madura de onde se obteve as espermatogônias a serem transplantadas (Fig. 3C). Devido à ausência de marcadores específicos, no presente estudo as espermatogônias iniciais (do tipo A) foram identificadas e selecionadas de acordo com características morfológicas. Dessa forma, a suspensão celular enriquecida com espermatogônias do tipo A (Fig. 3D) foi injetada no testículo de tilápias adultas através da papila urogenital (Fig. 3E). Em decorrência da adição de solução de azul de tripan a suspensão celular injetada, após o transplante, os testículos receptores apresentam-se completamente corados em azul (Fig. 3F), indicando que essa suspensão de células germinativas teve acesso aos túbulos seminíferos, conforme verificado na figura 3G. Dentro de uma a duas horas pós-transplante, as espermatogônias do doador podem ser observadas no lume dos túbulos seminíferos receptores (Fig. 3H).

### **4.3 – TRANSPLANTE SINGÊNICO: DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS TRANSPLANTADAS**

#### **4.3.1 – Tilápia-nilótica – Tilápia-nilótica:**

Além da presença de espermatogônias isoladas ou formando pequenos grupos celulares na luz dos túbulos seminíferos ou junto das células de Sertoli observadas com 14 horas após o transplante (Fig. 4A-D), as análises dos testículos receptores através de microscopia de fluorescência mostraram a presença de células com arranjo cístico marcadas com PKH26, a partir da segunda semana após o transplante (Figura 4E-R). Esses cistos eram evidenciados em diferentes tamanhos e presumivelmente em diferentes fases de desenvolvimento do processo espermatogênico (Fig. 4E-R). Particularmente, em torno de 8-9 semanas após o transplante, cistos de espermátides mais avançadas e espermatozóides no

lume dos túbulos seminíferos, marcados com PKH26 e possivelmente oriundos de espermatogônias transplantadas, foram encontrados nos testículos receptores (Fig. 4Q-T). Dentre todas as tilápias receptoras investigadas nesse experimento, 83% (33/40) apresentavam células germinativas PKH26 positivas em diferentes fases de desenvolvimento (colonização e/ou diferenciação) nos túbulos seminíferos (Tabela 1). No entanto, deve ser mencionado que, como os testículos de tilápia são relativamente longos, não se pode excluir totalmente que alguns deles pudessem eventualmente apresentar células germinativas transplantadas, pois, utilizando-se secções histológicas de 5µm torna-se difícil analisar um testículo completamente.

Indicando que as espermatogônias das tilápias doadoras são capazes de se auto-renovar e/ou se manter em estado quiescente no nicho espermatogonial, durante um longo período de tempo, espermatogônias PKH26 positivas isoladas foram observadas cinco semanas após o transplante, nos túbulos seminíferos receptores (Figura 5). Embora não tenha sido feito uma análise quantitativa pormenorizada, obtivemos um número relativamente pequeno de colônias e cistos por animal. No entanto, esses resultados inéditos obtidos mostram que espermatogônias de tilápia podem ser transplantadas com sucesso diretamente no testículo de receptores adultos da mesma espécie, onde estas células são capazes de colonizar, proliferar e se diferenciar nos túbulos seminíferos, formando espermatozóides maduros.

#### **4.3.2- Tilápia-nilótica (linhagem Ceará) – Tilápia-nilótica (linhagem Chitralada):**

Os resultados encontrados para o transplante entre estas duas linhagens (Ceará e Chitralada) de tilápias utilizadas também foram revestidos de sucesso. A Figura 6A mostra tilápias jovens resultantes do cruzamento de tilápias chitraladas e tilápias ceará (vermelhas). A avaliação do fenótipo desta prole mostra que o percentual de peixes cinza, híbridos e vermelhos foi de aproximadamente 50%, 25% e 25%, respectivamente. Após as análises dos perfis genéticos de todos os indivíduos, utilizando marcadores de microsatélite, encontrou-se, para o locus UNH104, em dois dos trinta e dois (6,25%) indivíduos da prole analisados, um alelo específico (171pb) compatível com o genótipo das tilápias doadoras (vermelhas) e não compatível com os alelos dos peixes receptores (chitraladas) (Figura 6B). Esses dois indivíduos da prole apresentavam ainda outro alelo (140pb) compatível com o genótipo das

fêmeas (linhagem chitralada). Desta forma, estes resultados mostraram que indivíduos da F1 eram de fato resultantes de espermatozóides originados das espermatogônias transplantadas.

#### **4.4 – CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOGÔNIAS DE TILÁPIA-NILÓTICA**

Os resultados obtidos sobre a viabilidade das espermatogônias de tilápias criopreservadas estão apresentados na Figura 7. Conforme pode ser observado, os protocolos que resultaram em maior taxa de sobrevivência das células após o congelamento/descongelamento foram aqueles nos quais se empregou o DMSO como agente crioprotetor. Entretanto, dentro deste protocolo (DMSO), os percentuais obtidos para o resfriamento controlado e não controlado não foram estatisticamente significativo. Dessa forma, como o congelamento não controlado é um processo mais rápido, simples e barato, por não requer o uso de aparelhagem específica, optou-se por este protocolo para se criopreservar espermatogônias de tilápias, antes das mesmas serem transplantadas. Além disso, conforme pode ser observado na figura 8A, após o descongelamento, as espermatogônias de tilápias assim criopreservadas (DMSO não-controlado) foram capazes de sobreviver em cultura e mantiveram sua capacidade proliferativa, evidenciado pela incorporação de timidina triciada.

Ainda através do transplante verificou-se que após a criopreservação a funcionalidade das espermatogônias de tilápias é mantida (Fig. 8B-F). Desta forma, as análises dos testículos que receberam espermatogônias criopreservadas, mostraram que após a colonização as células doadoras transplantadas foram capazes de gerar cistos espermatogênicos PKH26 positivos (Fig. 8B-E) em 88% (7/8; Tabela 2) dos testículos das tilápias investigadas. Finalmente, com dez e onze semanas pós-transplante, cistos de espermátides avançadas (*spt*, Fig. 8E) e espermatozóides marcados com PKH26 no lume dos túbulos seminíferos (*spz*, Fig. 8F) foram observados nos testículos receptores.

#### **4.5 – IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O RECEPTOR NOTCH-1 NOS TESTÍCULOS DE TILÁPIAS-NILÓTICAS**

As reações de imunohistoquímica avaliadas mostraram que a expressão do receptor Notch-1 nos testículos de tilápias adultas é restrita as espermatogônias do tipo A (Fig. 9).

Outro aspecto observado foi que maior número de espermatogônias positivas para Notch-1 encontravam-se nas regiões dos túbulos seminíferos próximas a túnica albugínea (Fig. 9B-D), onde se concentram as espermatogônias caracterizadas como indiferenciadas (Schulz et al., 2010). Merece ser ressaltado que marcações positivas foram obtidas em 100% dos testículos dos animais analisados (n=5).

#### **4.6- TRANSPLANTE XENOGÊNICO**

##### **4.6.1-Tucunaré – Tilápia-nilótica:**

Os resultados da análise dos testículos de tilápias-nilóticas que receberam células germinativas de tucunaré (*Cichla monoculus*) indicam que, nos intervalos de tempo avaliados (2 e 4 semanas), essas células são capazes de colonizar e proliferar nos testículos de tilápias (Fig. 10). Assim, duas semanas após o transplante observa-se células isoladas marcadas com PKH26 nos túbulos seminíferos dos receptores (Fig. 10C e F). Já na quarta semana pós-transplante, células germinativas de tucunaré formavam evidentes cistos espermatogênicos nos túbulos seminíferos das tilápias receptoras (Fig 10I). Nesse experimento, as três tilápias receptoras investigadas apresentaram colônias/cistos espermatogênicos originárias de células germinativas de tucunaré.

##### **4.6.2- Rã-touro – Tilápia-nilótica:**

Após o transplante de células germinativas de rã-touro para tilápias, nos diferentes intervalos de tempo investigados (1-8 semanas), células germinativas dos doadores marcadas com PKH26 foram observadas nos testículos receptores. Essas células apresentavam-se isoladas com uma semana após o transplante e, eventualmente, formavam cistos de espermatogônias, particularmente após a quarta semana (Fig. 11C e F). Entre 7-8 semanas pós-transplante, a presença de cistos com maior número de células marcadas com PKH26 (Fig. 11I e L) era mais freqüente que nos outros períodos investigados. Os resultados obtidos mostram que, dentre os peixes receptores analisados, 88% (8/9) e 66,6% (6/9) apresentaram, respectivamente, em seus testículos colonização e diferenciação das células transplantadas (Tabela 3). No entanto, não se observaram cistos espermatogênicos

marcados com PKH26 em estágios de desenvolvimento mais avançado, tais como espermatídes ou espermatozóides, que nas rãs-touro, diferente das tilápias, apresentam núcleo alongado.

#### **4.6.3- Rato – Tilápia-nilótica:**

Com duas semanas após o transplante (Fig. 12A<sub>1</sub>), os testículos de tilápias que receberam células germinativas de rato, avaliados através de microscopia de luz, mostraram espermatogônias do doador em contato com as células de Sertoli dos peixes receptores. Surpreendentemente, em algumas regiões dos testículos de tilápias sacrificadas, cinco semanas após o transplante, células germinativas de rato foram capazes de se desenvolver até estágios mais avançados do processo espermatogênico, formando inclusive espermatídes arredondadas e alongadas (Fig. 12B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>). Merece ser ressaltado que pelo fato dos ratos doadores serem imaturos (dez dias de vida), somente espermatogônias estavam presentes nos testículos dos mesmos. Assim, os espermatócitos e espermatídes de ratos observados nos túbulos seminíferos das tilápias certamente foram oriundos das espermatogônias transplantadas.

Com relação ao transplante de espermatogônias de ratos GFP-transgênicos para tilápia, com sete semanas após o transplante, grupos de células GFP positivas, presumivelmente células germinativas, foram observadas nos testículos das tilápias receptoras (Figura 13F, L, I), confirmando assim os resultados encontrados anteriormente para os ratos normais. Nos experimentos com rato, todos (6/6) os peixes receptores investigados apresentavam células do doador em seus testículos em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 4).

## 5 – DISCUSSÃO

No nosso conhecimento, este é o primeiro relato de sucesso do transplante não cirúrgico de espermatogônias-tronco no testículo de peixes adultos. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que, cerca de dois meses após o transplante singênico de espermatogônias, os testículos de tilápia sexualmente maduras são capazes de gerar espermatozóides funcionais e prole apresentando o genótipo dos animais doadores. Da mesma forma, num período de tempo semelhante, espermatogônias de tilápias criopreservadas e descongeladas também foram capazes de dar origem a espermatozóides nos testículos receptores após o transplante singênico. A adequabilidade de machos adultos de tilápia como modelo receptor para o transplante de células germinativas xenogênicas também foi demonstrada utilizando-se espermatogônias provenientes de outra espécie de teleósteo (tucunaré, *C. monoculus*), bem como de espécies de vertebrados pertencentes a diferentes classes (rã-touro, *L. catesbeianus* e rato, *R. norvegicus*). Inúmeras aplicações importantes derivam dessas investigações. Em combinação com o cultivo *in vitro*, a modificação genética e a criopreservação de células-tronco espermatogoniais (também realizado no presente estudo), esta técnica poderá facilitar e melhorar a biotecnologia aplicada à piscicultura, bem como a produção de modelos de peixes transgênicos utilizando espermatogônias transfectadas. Além disso, a técnica de transplante por nós desenvolvida apresenta potenciais aplicações na conservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção e na produção de espécies de peixes com valor comercial.

A análise seqüencial em diferentes períodos de tempo após o transplante singênico revelou que, após a colonização, as espermatogônias exógenas proliferaram e resultaram na produção de espermatozóides funcionais no testículo receptor adulto dentro de um período muito curto (~9 semanas). Estes gametas produziram uma progênie normal através da fertilização natural e o genótipo dos peixes doadores foram detectados em indivíduos da geração F1. O curto período necessário para a formação de espermatozóides férteis em tilápias-nilóticas, após o transplante, contrasta com o da técnica desenvolvida em

salmonídeos, na qual leva-se mais de um ano para a geração espermatozoides férteis após o transplante de células germinativas primordiais (PGCs ou espermatogônias) em larvas recém-eclodidas (Takeuchi et al., 2004; Okutsu et al., 2006b; Okutsu et al., 2007). Além disso, como a eficiência da colonização nesta abordagem é afetada pela idade do receptor, as células do doador devem ser transferidas dentro de um período de tempo muito curto durante o desenvolvimento embrionário do animal receptor (Takeuchi et al., 2009). Contrapondo todas essas limitações, o método descrito no presente estudo, tem o potencial de ser amplamente aplicável a várias espécies de peixes.

Outros estudos têm demonstrado que, quando transplantadas por microinjeção em blástulas de peixes, PGCs (Saito et al., 2008) e blastômeros (Lin et al., 1992; Takeuchi et al., 2001; Ciruna et al., 2002) são incorporados à blástula receptora, dando origem a quimeras que produzem espermatozoides funcionais com características genéticas dos peixes doadores. Entretanto, para que esta técnica seja eficiente, blástulas doadoras e receptoras precisam estar no mesmo estágio de desenvolvimento, o que pode ser difícil de se determinar. Além disso, apesar de viáveis, estes métodos requerem a criação/manutenção a longo prazo dos peixes receptores. Em contraste, o uso de receptores sexualmente maduros, conforme estabelecido nos mamíferos (Brinster et al., 2002) e demonstrado no presente estudo, pode facilitar e encurtar consideravelmente o tempo necessário para obtenção de gametas e prole derivados do doador. Conforme evidenciado no nosso trabalho, o tempo necessário para a formação de gametas férteis foi de cerca de dois meses após o transplante. Sabe-se que, em tilápia-nilótica, a duração conjunta das fases meióticas e espermiogênicas (de pré-leptoteno/leptoteno até espermatozoides) é cerca de 10-11 dias (Vilela et al., 2003; Schulz et al., 2005). O atraso no desenvolvimento da espermatogênese após o transplante já foi previamente relatado (van Beek et al., 1990; Parreira et al., 1998). O reestabelecimento da espermatogênese exógena no testículo receptor não é imediata. Em mamíferos (van Beek et al., 1990; Parreira et al., 1998; Nagano et al., 1999; Ohta et al., 2000) foi mostrado que as células-tronco espermatogoniais transplantadas demandam pelo menos uma semana para se estabelecerem nos nichos disponíveis nos túbulos seminíferos (colonização), expandir sua população (proliferação) e se diferenciarem para formar células comprometidas com o processo espermatogênico. Normalmente, as espermatogônias dão origem aos espermátócitos após um número fixo de divisões mitóticas, que varia dependendo da espécie considerada (De Rooij et al., 2000; Nóbrega et al., 2009). Oito

gerações de espermatogônias são observadas em tilápias-nilóticas (Schulz et al., 2005). Portanto, o tempo gasto durante o processo espermatogênico na fase mitótica/espermatogonial, que ainda não está determinado em tilápias deve ser também considerado e somado aos 10-11 dias gastos nas fases meiótica/espermiogênica quando se procura estimar a duração do processo espermatogênico e o tempo necessário para formação do espermatozóide após o transplante nesta espécie.

No nosso conhecimento, este estudo também é o primeiro a investigar a viabilidade da criopreservação e do transplante após o congelamento/descongelamento de espermatogônias em peixes. De maneira geral, existem dois fatores principais que podem levar à morte celular durante o processo de congelamento/descongelamento: a formação de cristais de gelo intracelular e o choque osmótico. Durante o processo de congelamento, a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento causando a formação de gelo no meio extracelular, enquanto os componentes da célula super-resfriada permanecem descongelados, fato que acarreta aumento de osmolaridade. Com esse desequilíbrio osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando assim a desidratação celular (Mazur 1984, 2004). Uma adequada desidratação celular depende da velocidade do congelamento de forma a não provocar a lise da célula. No caso do congelamento lento, a célula fica exposta ao crioprotetor e ao estresse osmótico por tempo prolongado, o que pode acarretar a morte celular. Por outro lado, se a célula for congelada rapidamente a desidratação por congelamento não ocorre, as células se tornam cada vez mais super-resfriadas e, eventualmente, a solução intracelular que contem alto teor de água congela-se formando cristais de gelo que causam injúria mecânica às células (Steponkus e Webb, 1992). Dessa forma, o sucesso da criopreservação das células depende da velocidade do congelamento e da composição da solução onde as células são congeladas. Apesar da citotoxicidade moderada apresentada pelo dimetilsulfóxido (DMSO) (Brayton, 1986; Sojka, 1990; Stone, 1993), no presente trabalho, tanto para as técnicas de congelamento lento (não controlado) quanto rápido (controlado), as amostras contendo DMSO apresentaram maior viabilidade das espermatogônias se comparadas àquelas contendo etilenoglicol. Resultado semelhante também foi obtido para criopreservação de embriões de zebrafish (Higaki et al., 2009). Em contraste, Kobayashi e colaboradores (2003), em estudo investigando a criopreservação de PGCs de truta arco-íris, obtiveram sobrevivência significativamente maior dessas células utilizando meio contendo etilenoglicol



quando comparado ao DMSO. Apesar da composição lipídica da membrana plasmática ser enfatizada como principal fator relacionado às variações das taxas de sobrevivência obtidas com protocolos de criopreservação, estudos mostram que outros fatores inerentes a raça, espécie, tipo de célula e fatores diversos tais como a nutrição e a estação do ano, parecem afetar a criotolerância celular (Leibo, 1981; Seidel, 2006). Tais circunstâncias levam assim a utilização de um protocolo e de um crioprotetor para cada situação específica.

Na presente investigação, aparentemente foi requerido intervalo de tempo um pouco maior para a produção de espermatozóides do doador a partir do transplante de espermatogônias criopreservadas. Apesar do pequeno atraso no desenvolvimento da espermatogênese, demonstramos que as células-tronco espermatogoniais de tilápias podem ser criopreservadas com sucesso e que as mesmas são capazes de sobreviver em cultura e manter a sua funcionalidade após a criopreservação. No único relato da literatura dentro deste contexto, a produção de gametas viáveis derivados de PGCs de trutas criopreservadas foi demonstrada (Kobayashi et al., 2006). No entanto, diferentemente da técnica aqui descrita, as PGCs descongeladas foram transplantadas na cavidade celomática de larvas recém-eclodidas, e essas células foram capazes de se diferenciar em gametas apenas quando os receptores atingiam a maturidade sexual, isto é, cerca de dois anos após o transplante. Sabe-se que a criopreservação de gametas e embriões tem um grande potencial para a manutenção e preservação de espécies ameaçadas de extinção e que nesse aspecto a conservação da informação genética do macho e da fêmea é essencial. No entanto, embora esta técnica tenha sido aplicada com sucesso a espermatozóides de muitas espécies de peixes (Boryshpolets et al., 2009; Huang et al., 2009, Viveiros & Godinho, 2009), métodos confiáveis para a preservação a longo prazo de ovos e embriões de peixes são escassos (Zhang et al., 1989; Chao & Liao, 2000), principalmente devido ao fato dessas células apresentarem grande quantidade de vitelo (Chen & Tian, 2005). Dessa forma, a criopreservação de espermatogônias, que em peixes são capazes de gerar tanto espermatozóides quanto ovócitos (Okutsu et al., 2006a), efetivamente permite a preservação de todo potencial genético de espécies de teleósteos. Considerando-se a ameaça atual de extinção de várias espécies de ciclídeos (Witte et al., 1992; Seehausen et al., 1997), a criopreservação e o transplante xenogênico de espermatogônias no testículo de tilápias adultas podem, por exemplo, tornar possível a restauração populacional dessas espécies. Além disso, a criopreservação de espermatogônias também tem implicações

importantes na manutenção e propagação de linhagens ou de espécies de peixes que apresentam características comercialmente atraentes.

Conforme já mencionado, o número de células-tronco espermatogoniais no testículo é muito restrito (Nagano, 2003; Meistrich e van Beek, 1993; Tegelenbosch e de Rooij 1993). Isto nos levou à investigação de possíveis marcadores específicos, por exemplo o Notch-1, para a identificação das espermatogônias-tronco em tilápias-nilóticas. Em 2001, dois grupos de pesquisadores descreveram a expressão dos receptores Notch e seus ligantes, Jagged-1 e Jagged-2, nos testículos de mamíferos (Dirami et al., 2001; Hayashi et al., 2001). A via de sinalização Notch é altamente conservada no reino animal e está envolvida no destino das células durante os vários processos celulares e de desenvolvimento (Weinmaster, 1997). Em mamíferos, quatro genes *Notch* (*Notch1–4*) foram isolados (Weinmaster et al., 1991; Lardelli et al., 1994; Uyttendaele et al., 1996). Análises imunohistoquímicas revelaram que as proteínas da família Notch são ativadas em determinados tipos de células germinativas nos túbulos seminíferos de camundongos durante o desenvolvimento, e que seus ligantes são expressos pelas células de Sertoli (Dirami et al., 2001). von Schönfeldt e colaboradores (2004) descreveram o padrão de localização de Notch-1 em testículos de camundongos durante diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal e mostraram que este receptor era expresso em espermatogônias. Outros estudos mostraram que o Notch-1 está especificamente envolvido com a diferenciação espermatogonial em camundongos, humanos e em ensaios *in vitro* utilizando linhagem imortalizada de espermatogônias-tronco (Hayashi et al., 2001; 2004; Kostereva & Hofmann, 2008). Particularmente em peixes, em estudo pioneiro envolvendo a utilização de microarray, o receptor Notch-1 foi recentemente proposto como marcador molecular específico para espermatogônias do tipo A em truta arco-íris (Yano et al., 2009). No presente trabalho, avaliou-se, através de imunohistoquímica, a localização de Notch-1 nos testículos de tilápias-nilóticas adultas e também demonstramos que a expressão do receptor Notch-1 é encontrada de forma específica nas espermatogônias do tipo A, particularmente nas espermatogônias localizadas nas regiões dos túbulos seminíferos próximas à túnica albugínea consideradas mais imaturas (Vilela, 2003). Esses resultados corroboram estudos prévios que descrevem que no testículo de tilápias-nilóticas, próximo à túnica albugínea, concentram-se as espermatogônias caracterizadas através de critérios morfológicos (microscopia de luz e eletrônica) como espermatogônias A indiferenciadas (Schulz et al., 2010). A identificação adequada e o isolamento das

espermatogônias-tronco (células contidas no grupo de espermatogônias do tipo A imaturas) são fundamentais para a maior eficiência do transplante, bem como para compreender o comportamento/biologia destas células após o transplante. Entretanto, o isolamento e o estudo mais aprofundado das células-tronco espermatogoniais em peixes têm sido limitados. Nesse contexto, a partir dos resultados encontrados no presente estudo, o receptor Notch-1 pode potencialmente ser utilizado para se selecionar e caracterizar funcionalmente as espermatogônias do tipo A indiferenciada/tronco. Desta forma, o maior número de espermatogônias-tronco gerado pelo enriquecimento *in vitro* irá propiciar novas e auspiciosas dimensões ao transplante de espermatogônias em peixes. Assim, o estabelecimento de um sistema de cultivo de espermatogônias-tronco em teleósteos, ou o co-cultivo destas células com linhagens de células somáticas (ex: células de Sertoli), permitiria investigar importantes aspectos funcionais e regulatórios da biologia das espermatogônias-tronco em condições bem definidas como, por exemplo, o estudo do efeito de vários fatores de crescimento que influenciam ou mesmo determinam o destino (auto-renovação/diferenciação) dessas células. Este sistema de cultura permitiria ainda desenvolver estratégias para amplificar o número de espermatogônias-tronco de espécies de peixes raras, ameaçadas de extinção ou de interesse comercial, as quais poderiam ser, posteriormente, criopreservadas e/ou transplantadas.

Ampliando ainda mais as questões que abordam a regulação da espermatogênese e da biologia de células-tronco espermatogoniais, a técnica aqui aplicada também se mostrou viável para o xenotransplante. Embora os testículos de tilápia não tenham sido avaliados por um longo período, as células germinativas de *C. monoculus* foram pelo menos capazes de colonizar e formar cistos espermatogênico no epitélio seminífero do receptor, sugerindo que o microambiente testicular da tilápia adulta fornece as condições necessárias para o desenvolvimento da espermatogênese de uma diferente espécie de ciclídeo. Neste contexto, como potencial aplicação desta técnica, ao se empregar o transplante xenogênico envolvendo por exemplo duas espécies de peixes filogeneticamente próximas, o período do ciclo de vida de uma dada espécie pode ser significativamente reduzido se, eventualmente, a espécie-receptora apresentar um curto período de tempo para atingir a maturidade sexual. Além disso, espécies com valor comercial que apresentam alto custo de produção, de difícil manutenção, ou mesmo aquelas que necessitam de grandes espaços para criação, que não se reproduzem em cativeiro ou apresentam reprodução sazonal, pode ter, potencialmente, a

produção de gametas facilitada e/ou aumentada usando espécies receptoras adequadas. Levando-se em conta todos os atributos positivos já mencionados, a tilápia-nilótica representa um modelo receptor excelente.

Ainda no contexto do transplante xenogênico, demonstramos que os testículos de tilápias adultas são capazes de suportar a sobrevivência e o desenvolvimento das células germinativas de rã-touro. A fase do desenvolvimento espermatogênico alcançado pelas células germinativas de *L. catesbeianus* no testículo receptor após o transplante foi possivelmente similar àquela atingida pelas células de *C. monocus* após o transplante; observou-se a formação de cistos de espermatogônias e, provavelmente, o seu desenvolvimento através de consecutivas divisões mitóticas em cistos de espermatogônias mais avançadas. É possível que uma maior diferenciação das células germinativas de rã ou mesmo espermatogênese completa não tenha sido observada no presente estudo porque esse processo exigiria um período de tempo mais longo. Estudos recentes em nosso laboratório mostraram que a duração da espermatogênese é muito maior na rã-touro quando comparada a de peixes (Segatelli et al., 2009). No entanto, a observação de que células germinativas de rã-touro são capazes de interagir com células de Sertoli de tilápia e iniciar o processo espermatogênico é um achado extraordinário por si mesmo.

Investigando de forma mais abrangente mais a fundo a plasticidade filogenética do testículo de tilápias, observamos que espermatogônias isoladas de ratos de dez dias de idade foram capazes de completar a meiose nos túbulos seminíferos de tilápias e atingir a fase de diferenciação ou espermiogênica. Assim, várias semanas pós-transplante, espermátides de ratos apresentando morfologia característica desta espécie de mamífero (i.e., maior volume celular, presença de acrossoma e alongamento nuclear), que é muito distinta da morfologia das células germinativas de tilápias (Vilela, 2003; Schulz et al., 2005), foram observadas nos testículos receptores. Estes importantes achados demonstram que os aspectos estruturais, funcionais e regulatórios promovidos pelo microambiente testicular de tilápias são adequados para que as células germinativas de ratos colonizem e se desenvolvam rumo a fases mais avançadas do processo espermatogênico.

Pouco contato entre as células germinativas de ratos e o epitélio seminífero de tilápia foi observado. Exceto para espermatogônias com características de células indiferenciadas que se encontravam em íntimo contato com as células de Sertoli. Pode-se, portanto, considerar que fatores de crescimento biologicamente ativos e/ou moléculas sinalizadoras

constituem o fluido testicular presente no lúmen dos túbulos seminíferos de tilápias. Como os peixes teleósteos não possuem epidídimo, após a espermiacção os espermatozóides são normalmente armazenados no lúmen dos túbulos seminíferos permanecendo assim em suspensão no fluido secretado pelas células de Sertoli, ou nos dos ductos extratesticulares (Schulz et al., 2010). Merece, no entanto, ser ressaltado que, em algumas espécies de teleósteos, as fases finais do desenvolvimento espermatogênico ocorrem fora dos cistos espermatogênicos sem nenhum contato direto entre as células de Sertoli e as células germinativas (Pudney, 1995; Mattei et al., 2003). Nesta situação, quando a meiose é concluída, os cistos espermatogênicos se abrem e as espermátides iniciais são liberadas no lúmen tubular, onde o fluido secretado pelas células de Sertoli é capaz de suportar todo processo de diferenciação espermiogênica a maturação de espermatozóides. Portanto, o fluido tubular em peixes pode fornecer um adequado sistema de cultura *in vivo* para o desenvolvimento das células germinativas no transplante xenogênico; uma hipótese intrigante que certamente merece ser experimentalmente testada. Experimentos utilizando a injeção intracitoplasmática de espermátides ou de espermatozóides (ROSI/ELSI/ICSI) também necessitam ser realizados para testar se células germinativas mais diferenciadas de ratos, originadas de espermatogônias transplantadas nos testículos de tilápias seriam capazes de gerar prole normal. Sugerindo que células de rato em estágios mais avançados do processo espermatogênico não foram achados ocasionais, ou seja, resultantes de espermatogônias mais diferenciadas eventualmente transplantadas, espermatogônias de rato com características de células indiferenciadas foram observadas em contato direto com as células de Sertoli de tilápia.

Ao contrário do que tem sido demonstrado em mamíferos (Dobrinski et al., 1999; 2000; Nagano et al., 2001a), os resultados encontrados no transplante de células germinativas de rã e rato não corroboram a hipótese de que a distância filogenética entre o doador e o receptor limita o desenvolvimento das células germinativas transplantadas. Talvez essa limitação esteja mais relacionada à adequação do ambiente nos testículos receptores, que pode ser mais plástico na tilápia (ou em outros vertebrados inferiores) e se torna mais especializado durante a evolução. Neste raciocínio, trabalho recente realizado no nosso laboratório mostrou que embora sejam reconhecidas pelas células de Sertoli receptoras, espermatogônias de tilápias transplantadas nos túbulos seminíferos de camundongos resultam apenas em baixo grau de colonização (Batlouni et al., 2008b)

Consequentemente, células germinativas de tilápias em estágios mais avançados não são observadas. Portanto, a incapacidade das células germinativas de tilápia de prosseguir através do processo espermatogênico (proliferação, meiose e espermiogênese) nos testículos de camundongos reforça a hipótese de que o ambiente testicular de mamíferos pode ser mais especializado do que de vertebrados ditos inferiores. Assim, os fatores e moléculas endógenas fundamentais para a espermatogênese em camundongos não seriam compatível com as células germinativas de peixes. Pelo menos em mamíferos, considera-se que a presença de fatores de crescimento, citocinas ou outros sinais parácrinos no testículo receptor, provavelmente determinam o sucesso da espermatogênese xenogênica (Dobrinski et al., 2000). Dessa forma, além das várias importantes implicações e aplicações previamente mencionadas, o transplante de células germinativas envolvendo espécies filogeneticamente distantes representa uma valiosa ferramenta para melhor compreender os eventos celulares e moleculares que controlam a auto-renovação, proliferação e diferenciação das células-tronco espermatogoniais. Da mesma forma, esta importante abordagem propicia o desenvolvimento de novos estudos envolvendo a regulação da meiose e espermiogênese em vertebrados, bem como o melhor entendimento das interações entre as células germinativas e as células de Sertoli.

Os procedimentos relatados no presente trabalho para o transplante singênico e xenogênico de células germinativas em tilápia-nilótica estão ilustrados na Figura 14. Com base nos importantes resultados encontrados, conclui-se que uma nova e vantajosa técnica não-cirúrgica de transplante de células germinativas foi desenvolvida, possibilitando um método rápido e viável para a produção de espermatozoides férteis em peixes. Em associação com a criopreservação de células germinativas, esta técnica apresenta-se como uma alternativa para estudos relacionados à biotecnologia e à aqüicultura, fornecendo ainda possibilidade de se realizar a transgênese e a preservação do material genético de espécies ameaçadas de extinção e de espécies de peixes de alto valor comercial. Num outro importante aspecto, foi também desenvolvida uma valiosa abordagem para se investigar a biologia das espermatogônias-tronco e da espermatogênese em vertebrados.

## 6 – FIGURAS

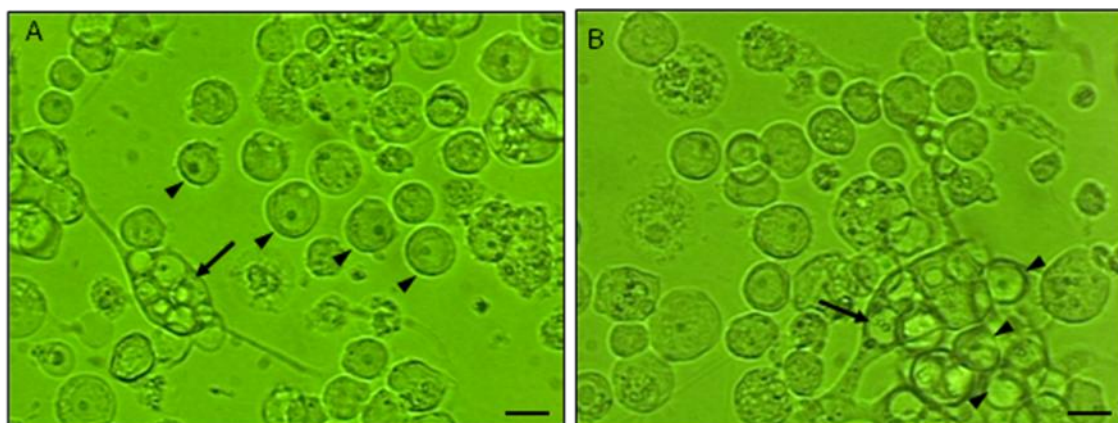


Figura 1. Plaqueamento seletivo por adesão de células testiculares de tilápia. Após 12 horas de cultivo, observa-se a presença de eventuais células somáticas (fusiformes ou estreladas) que se aderem à placa de cultura (setas). As células germinativas, principalmente espermatogônias, permanecem livres no meio (**A**, cabeças de setas) ou mesmo fracamente aderidas às células somáticas (**B**, cabeças de seta), formando agrupamentos celulares. Barra=10 $\mu$ m.

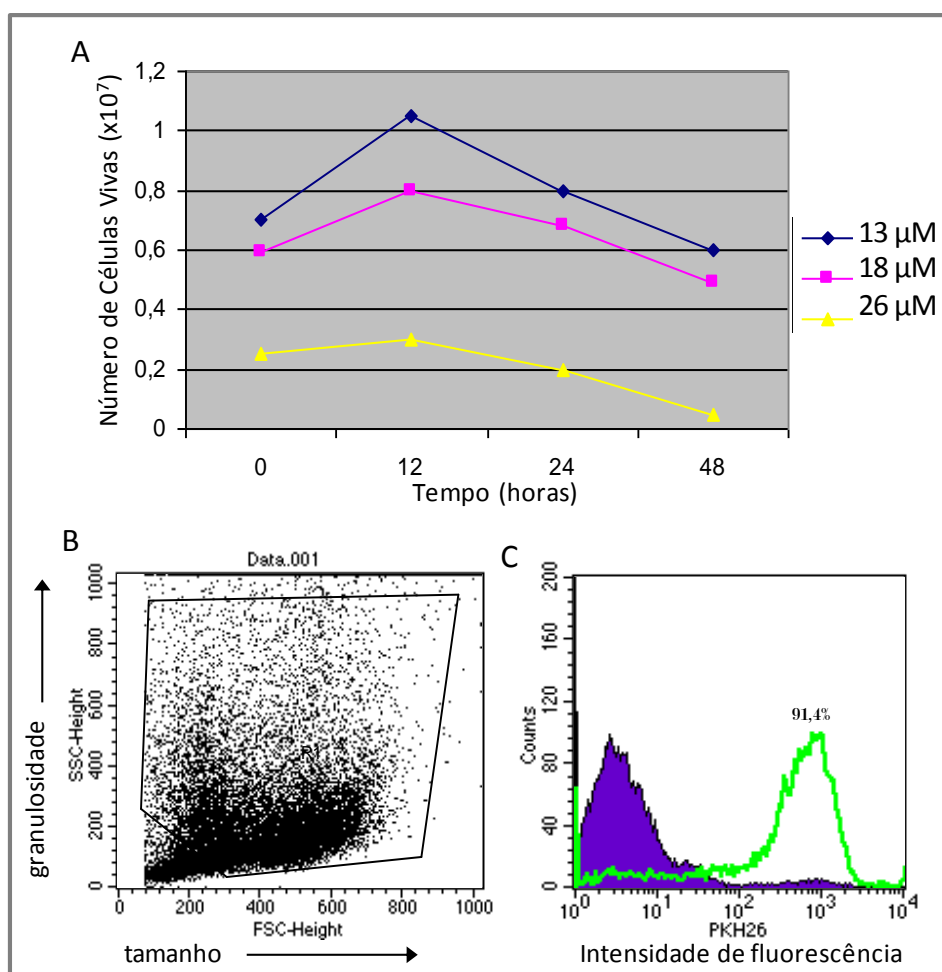


Figura 2. Marcação das células germinativas de tilápias-nilóticas. **A.** Viabilidade das células germinativas de tilápia-nilótica marcadas com três diferentes concentrações do corante PKH26 (13, 18 e 26 $\mu\text{M}$ ) avaliada imediatamente após a marcação e com 12, 24 e 48 horas em cultura, após a marcação. **B** e **C.** Visualização dos dados obtidos por citometria de fluxo para marcação das células germinativas de tilápia com PKH26 na concentração de 18 $\mu\text{M}$ . **B.** Seleção da população celular obtida. **C.** Histograma representando o percentual de células PKH26 positivas. O pico em azul representa o perfil do grupo controle (células não marcadas) e em verde o perfil das células marcadas (91,4%).



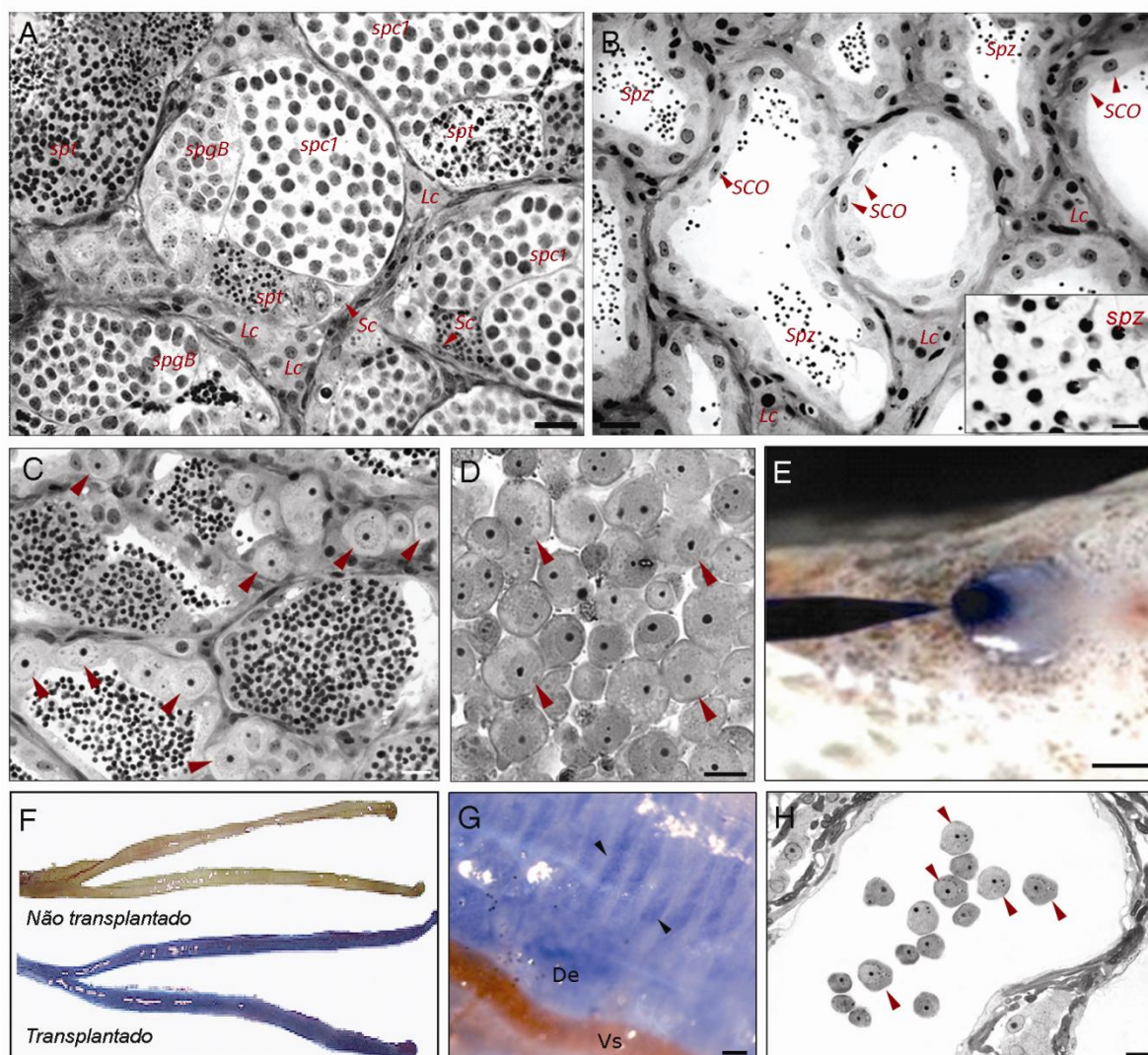


Figura 3. Injeção das células germinativas do doador no testículo de tilápias adultas. Histologia do testículo de tilápia sexualmente madura mantida à 35°C, controle (A) e tratada com busulfan (B). Observe que os túbulos seminíferos dos peixes controles apresentam cistos espermatogênicos em diferentes fases do desenvolvimento (A), enquanto túbulos seminíferos apresentando apenas células de Sertoli (*Sertoli cell-only*, SCO) estão presentes nos testículos das tilápias tratadas com busulfan, embora alguns espermatozoides (spz, em detalhe) remanescentes da espermatogênese normal antes do tratamento, ainda sejam encontrados no lumen desses túbulos seminíferos (B). C. Histologia do testículo de tilápia adulta evidenciando a morfologia das espermatogônias do tipo A (cabeças de setas). D. Suspensão de células do doador enriquecida com espermatogônias do tipo A (cabeças de setas) obtidas através de centrifugação em gradiente de densidade (percoll) e plaqueamento diferencial. Para a injeção das células germinativas dadoras (D), uma micropipeta é inserida no ducto espermático comum que se abre na papila urogenital (E). Após a injeção, os testículos transplantados se coram em azul (F), devido a presença do corante azul de tripan na suspensão celular injetada. A aparência dos testículos de uma tilápia receptora que não recebeu o transplante de células germinativas está mostrada na parte superior da figura 3F. Em maior aumento, nos testículos transplantados o lumen dos túbulos seminíferos estão completamente preenchidos com a solução injetada (G, cabeças de setas). Uma hora após o transplante, espermatogônias do doador são observadas no lumen dos túbulos seminíferos receptores (H, cabeças de setas). *spgB*: espermatogônias do tipo B, *spc1*: espermatócito primário, *spt*: espermátide, *Lc*: célula de Leydig, *De*: região dos ductos eferentes, *Vs*: vaso sanguíneo. Barra em A-B=20µm; detalhe em B=4µm; C,D,H=10µm; E=3mm e G=70µm.

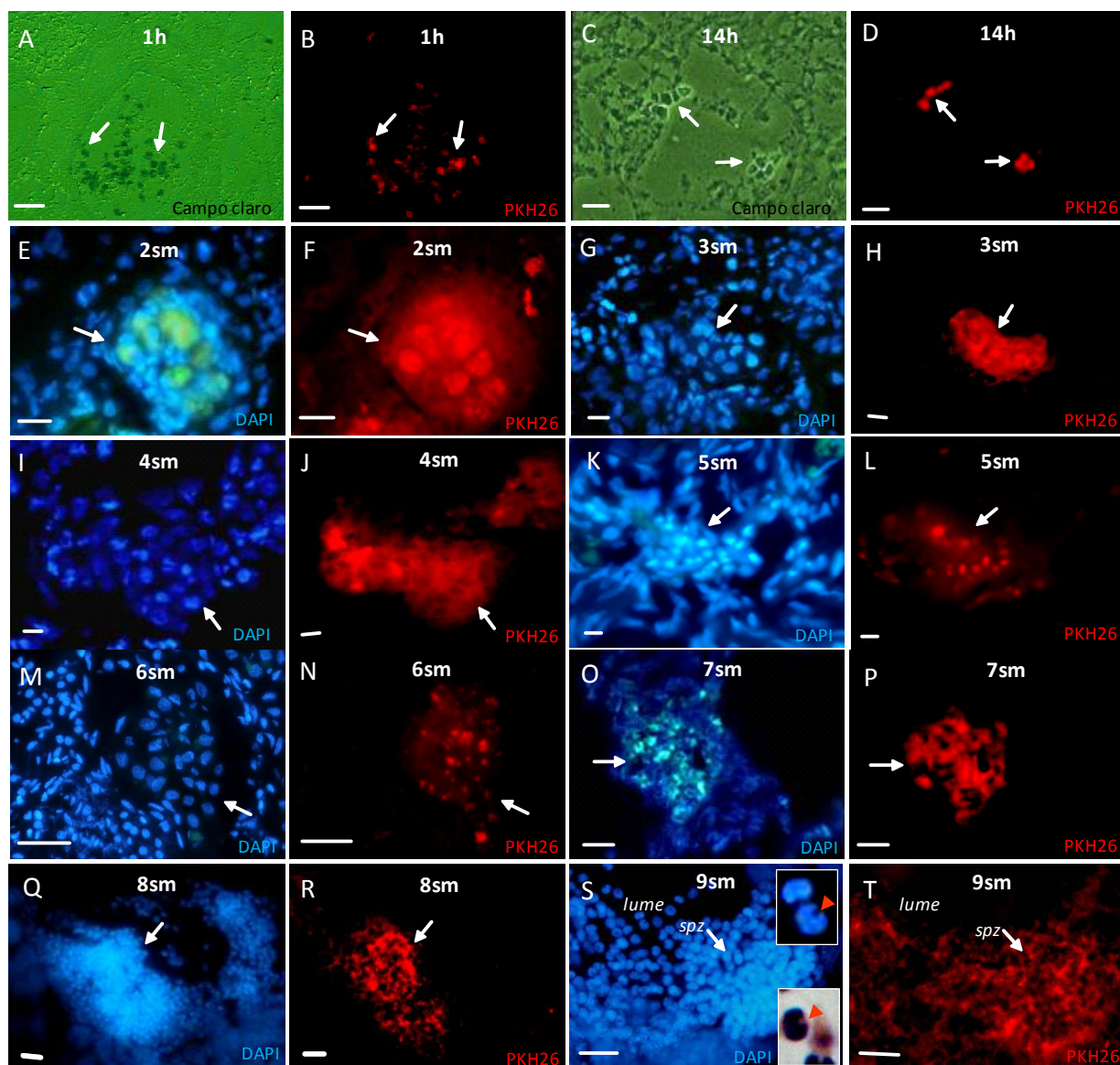


Figura 4. Transplante singênico (tilápia-tilápia). Avaliação histológica, através de microscopia de fluorescência dos testículos de tilápias receptoras de espermatogônias-tronco uma hora (A-B), 14 horas (C-D), 2 semanas (E-F), 3 semanas (G-H), 4 semanas (I-J), 5 semanas (K-L), 6 semanas (M-N), 7 semanas (O-P), 8 semanas (Q-R) e 9 semanas (S-T) após o transplante. Células germinativas isoladas marcadas com PKH26 (setas) são observadas no lume dos túbulos seminíferos (B) ou em contato com a parede dos túbulos seminíferos (D) uma e 14 horas pós-transplante, respectivamente. De duas a nove semanas após o transplante, essas células germinativas formavam cistos espermatogênicos evidentes (setas), apresentando tamanhos variados e diferentes estágios de desenvolvimento (F, H, J, L, N, P, R). Nove semanas após o transplante, células pequenas e arredondadas marcadas com PKH26 foram observadas no lume dos túbulos seminíferos (T, seta), representando espermatozoides espermiados (*spz*) oriundos de espermatogônias transplantadas. Os detalhes em S mostram em maior aumento os núcleos dos espermatozoides, evidenciando a fossa de implantação do flagelo (cabeças de setas). A primeira e a terceira colunas apresentam secções testiculares documentadas em campo claro (A, C) ou coradas com DAPI (E, G, I, K, M, O, Q, S). Barras em A-B=50µm; C-T=10 µm.

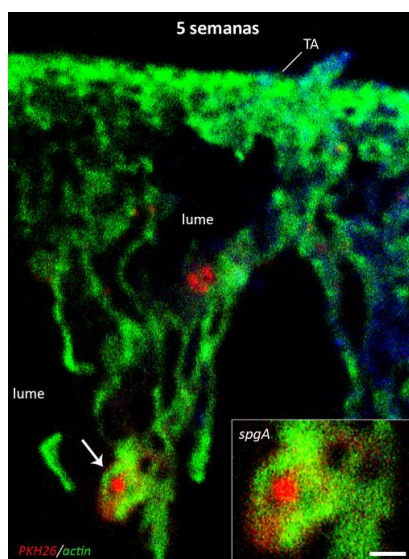


Figura 5. Análise em microscopia confocal de testículos de tilápias receptoras cinco semanas após o transplante. Espermatogônias isoladas PKH26 positivas ainda são observadas nos túbulos seminíferos receptores várias semanas após o transplante (seta). O detalhe mostra espermatogônia do doador (*spg*) em maior aumento. Em verde, observa-se a marcação para  $\beta$ -actina. TA: tunica albugínea. Barra=10 $\mu$ m.

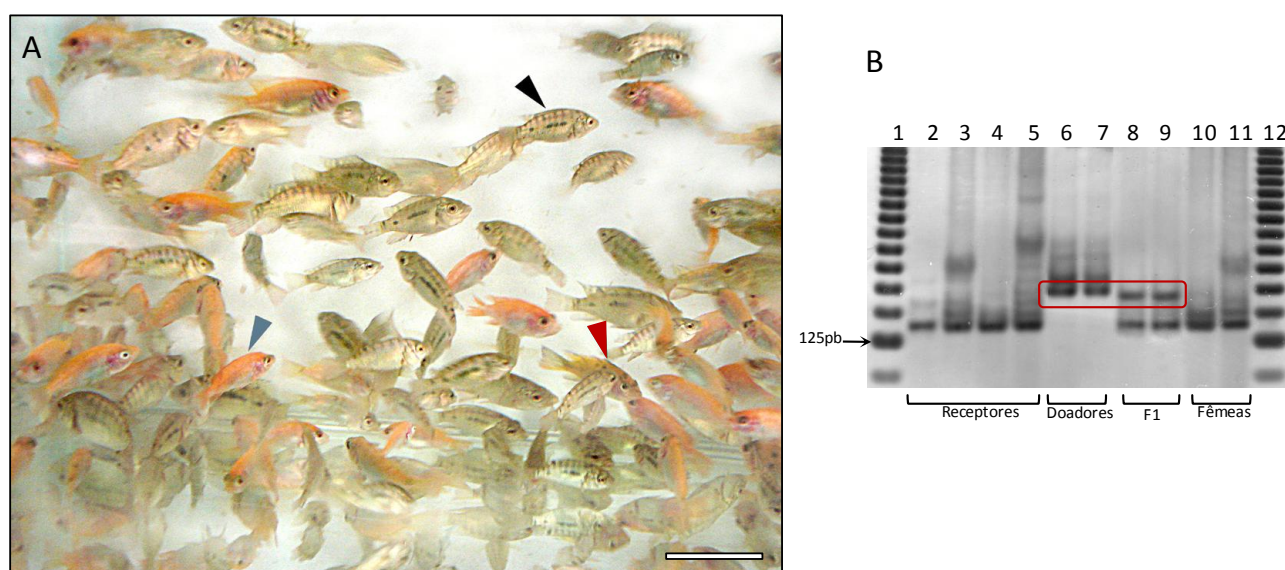


Figura 6. Análise de paternidade. **A.** Alevinos resultantes do cruzamento de tilápias chitraladas com tilápias vermelhas (linhagem Ceará). Observe que a maioria dos peixes apresenta a pigmentação da pele típica de tilápias chitraladas (cabeça de seta preta), enquanto em aproximadamente 50% dos peixes, a pigmentação da pele é similar as das tilápias vermelhas (~1/4, cabeça de seta azul) ou, além desta pigmentação, apresentam pintas escuras no corpo (~1/4, cabeça de seta vermelha). **B.** Análise do DNA genômico de tilápias para o locus de microsatélite UNH104. Os genótipos dos animais receptores (2, 3, 4, 5), doadores (6 e 7), prole (8 e 9) e mães (10 e 11) estão representados. Observe que os alelos específico dos doadores (171pb) foram detectados em indivíduos da prole (retângulo), sendo os mesmos incompatíveis com os alelos dos peixes receptores. Canaletas 1 e 12 indicam padrões de peso molecular (DNA ladder). Barra= 3 cm.

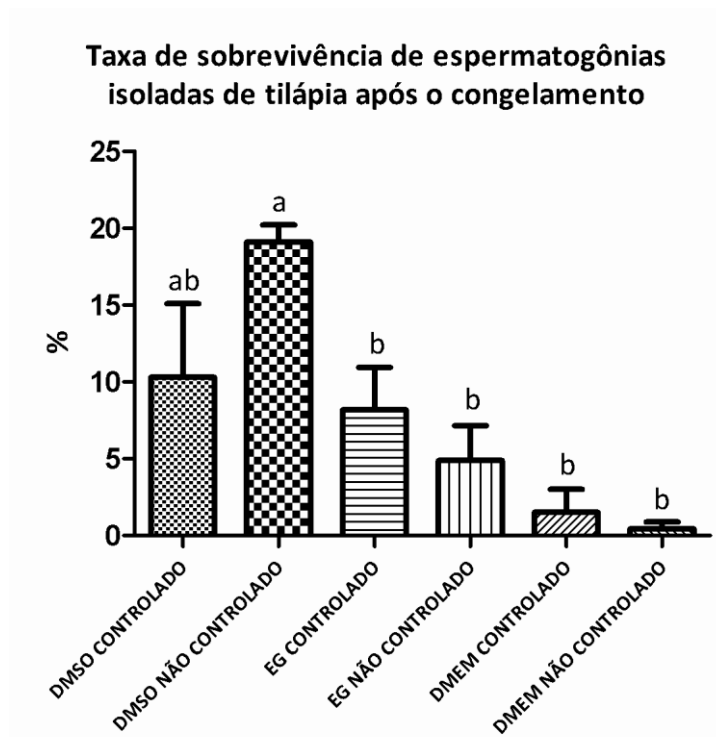


Figura 7. Efeito dos crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) na viabilidade de espermatogônias de tilápias submetidas ao congelamento controlado e não controlado. Observe que as maiores taxas de sobrevivência foram observadas nas amostras contendo DMSO.

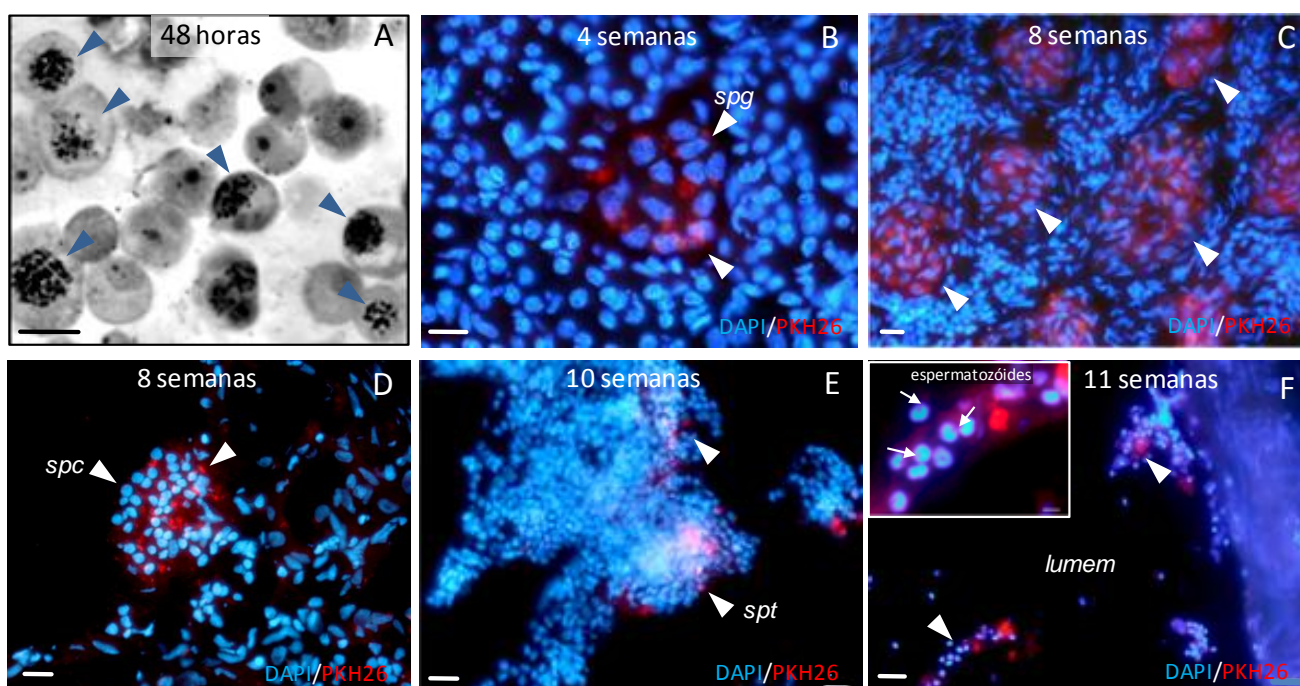


Figura 8. Transplante singênico de espermatogônias criopreservadas. **A.** Espermatogônias de tilápia marcadas com timidina triciada após o processo de congelamento/decongelamento (cabeças de setas), sugerindo uma boa atividade proliferativa mesmo após 48 horas em cultura. **B-F.** Visualização dos testículos de tilápias receptoras após o transplante de espermatogônias criopreservadas. A sobreposição das imagens de fluorescência mostra a co-localização do PKH26 (em vermelho) e DAPI (em azul). Entre quatro e dez semanas após o transplante (**B-E**), cistos espermatogênicos marcados com PKH26 foram observados nos túbulos seminíferos receptoras (cabeças de setas) em diferentes fases de desenvolvimento. Baseado no número e tamanho das células germinativas presentes, entre estes cistos encontram-se aqueles com aparência de espermatogônias (**spg**), espermatócitos (**spc**) e espermatídes (**spt**). Onze semanas pós-transplante, espermatozóides PKH26 positivos dos doadores foram detectados no lumem dos túbulos seminíferos receptoras (**F**, cabeças de setas). O detalhe em **F** mostra em maior aumento os núcleos dos espermatozóides evidenciando-se a fossa de implantação do flagelo (setas). Barra em A-F=10 $\mu$ m; Detalhe= 2  $\mu$ m.

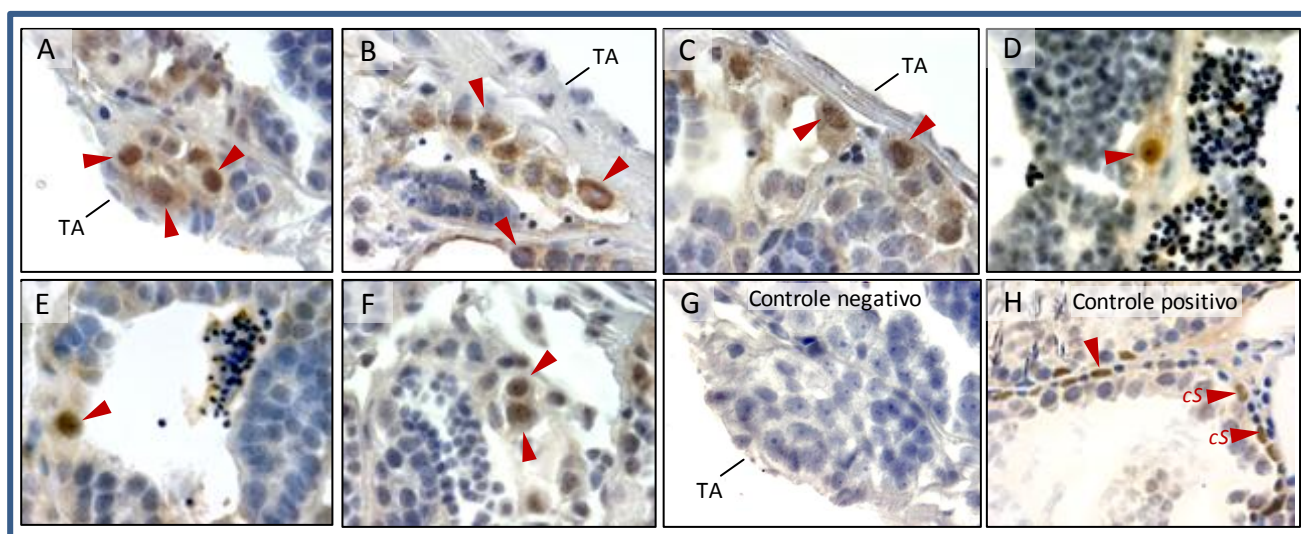


Figura 9. Detecção através de imunohistoquímica do receptor Notch-1 nos testículos de tilápias-nilóticas. Observe que a imunoreatividade para Notch-1 é encontrada somente nas espermatogônias do tipo A (A-F, cabeças de setas), particularmente naquelas localizadas nas regiões dos túbulos seminíferos próximas à túnica albugínea (TA) (A-C). G. Controle negativo no qual o anticorpo primário foi omitido. H. Controle positivo, no qual túbulos seminíferos de rato mostram células de Sertoli (cS) marcadas.

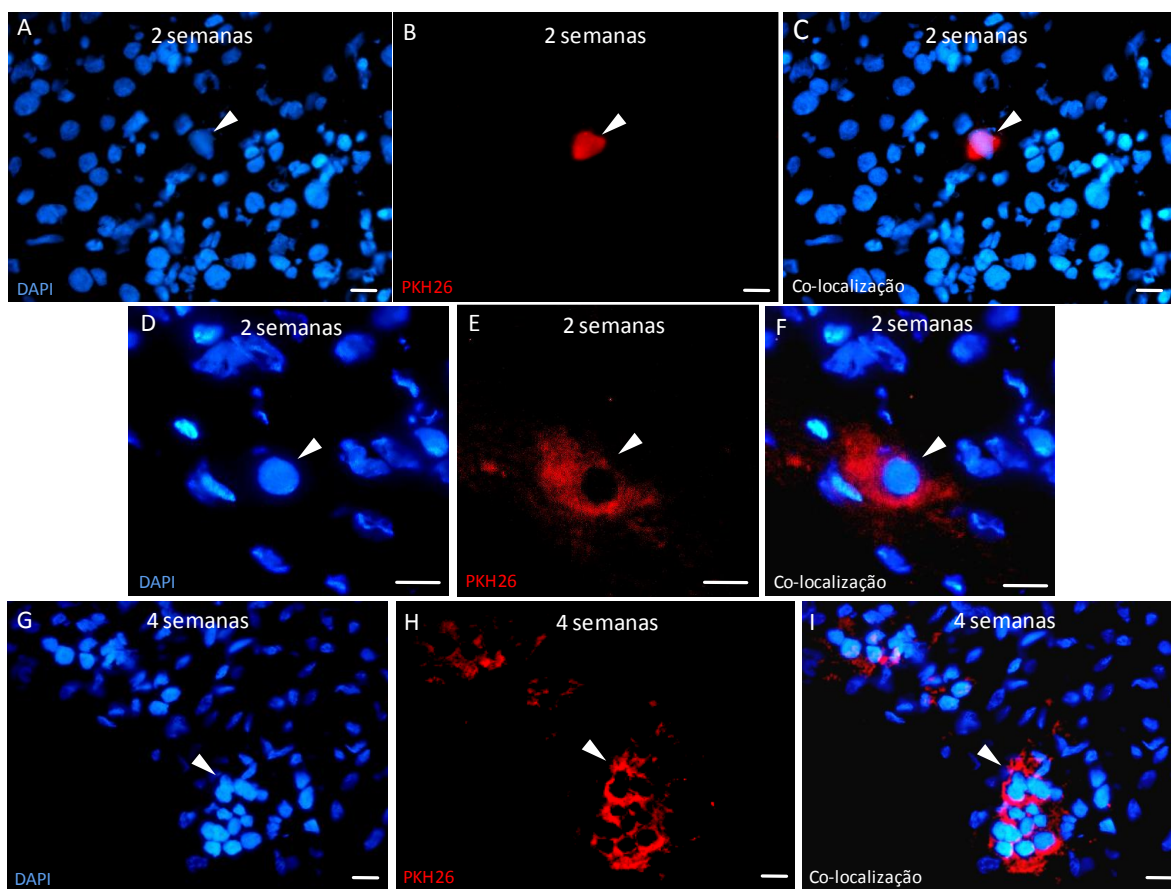


Figura 10. Transplante xenogênico (tucunaré-tilápia). Visualização de testículos de tilápias receptoras 2 semanas (A-F) e 4 semanas (G-I) após o transplante de células germinativas de tucunaré (*Cichla monoculus*). Observe a presença de células germinativas isoladas (B, E) ou cistos de células germinativas (H) oriundas de espermatogônias de tucunaré marcadas com PKH26 em vermelho (cabeças de setas). Na coluna da esquerda, os mesmos campos podem ser vistos através da marcação com DAPI para núcleos (A, D, G). Enquanto a coluna da direita mostra as sobreposições das imagens presentes nas duas outras colunas (C, F, I). Barra= 10 $\mu$ m

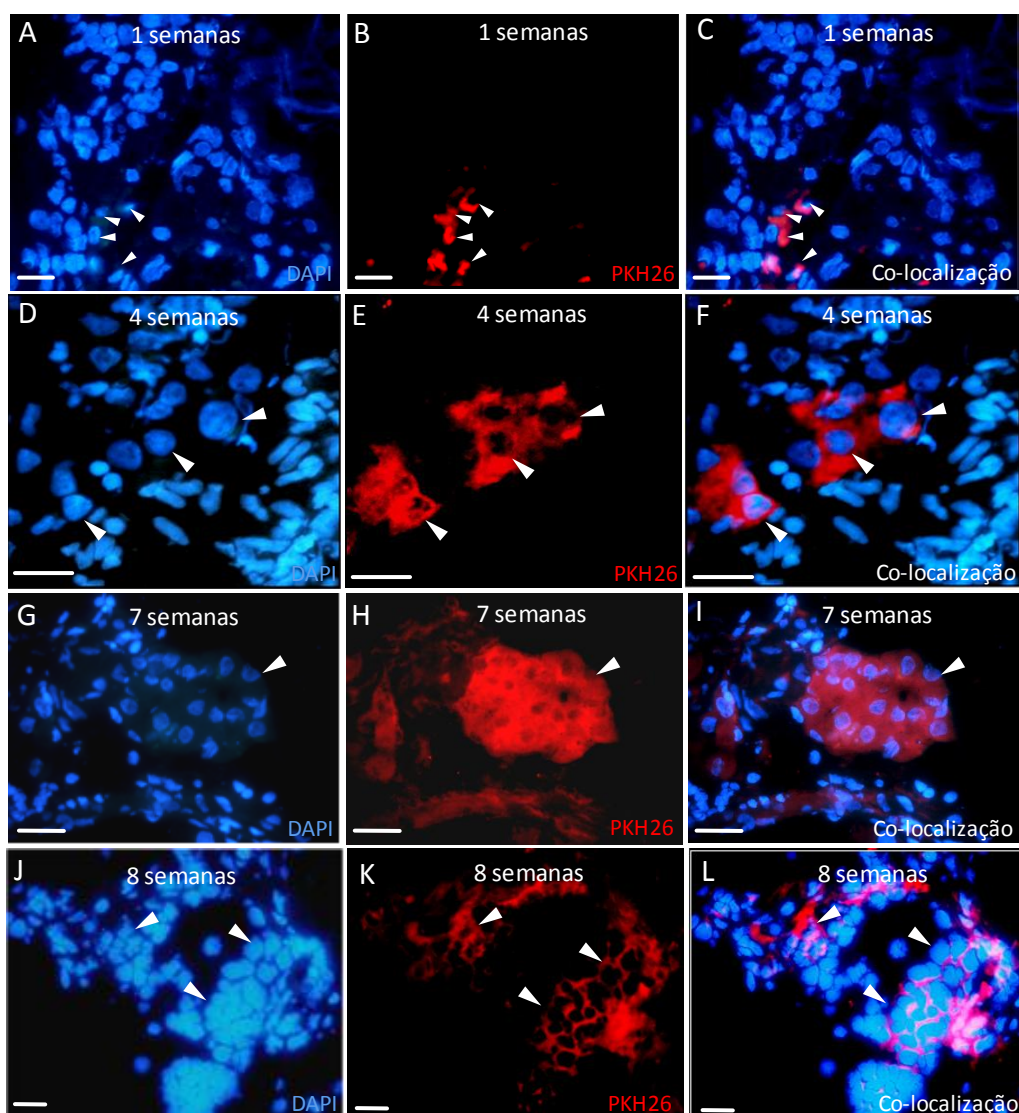


Figura 11. Transplante xenogênico (rã-tilápia). Análise histológica, em microscopia de fluorescência, dos testículos de tilápias que receberam células germinativas de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) sacrificadas 1 semana (A-C), 4 semanas (D-F), 7 semanas (G-I) e 8 semanas (J-L) após o transplante de células germinativas. Observe a presença de cistos de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento, oriundos de espermatogônias de rãs marcadas com PKH26 em vermelho (cabeças de setas em B, D, F, H). Na coluna da esquerda, os mesmos campos podem ser vistos através da marcação com DAPI (A, D, G, J), enquanto a coluna da direita mostra a sobreposição das duas outras colunas (C, F, I, L). Barra= 20µm.



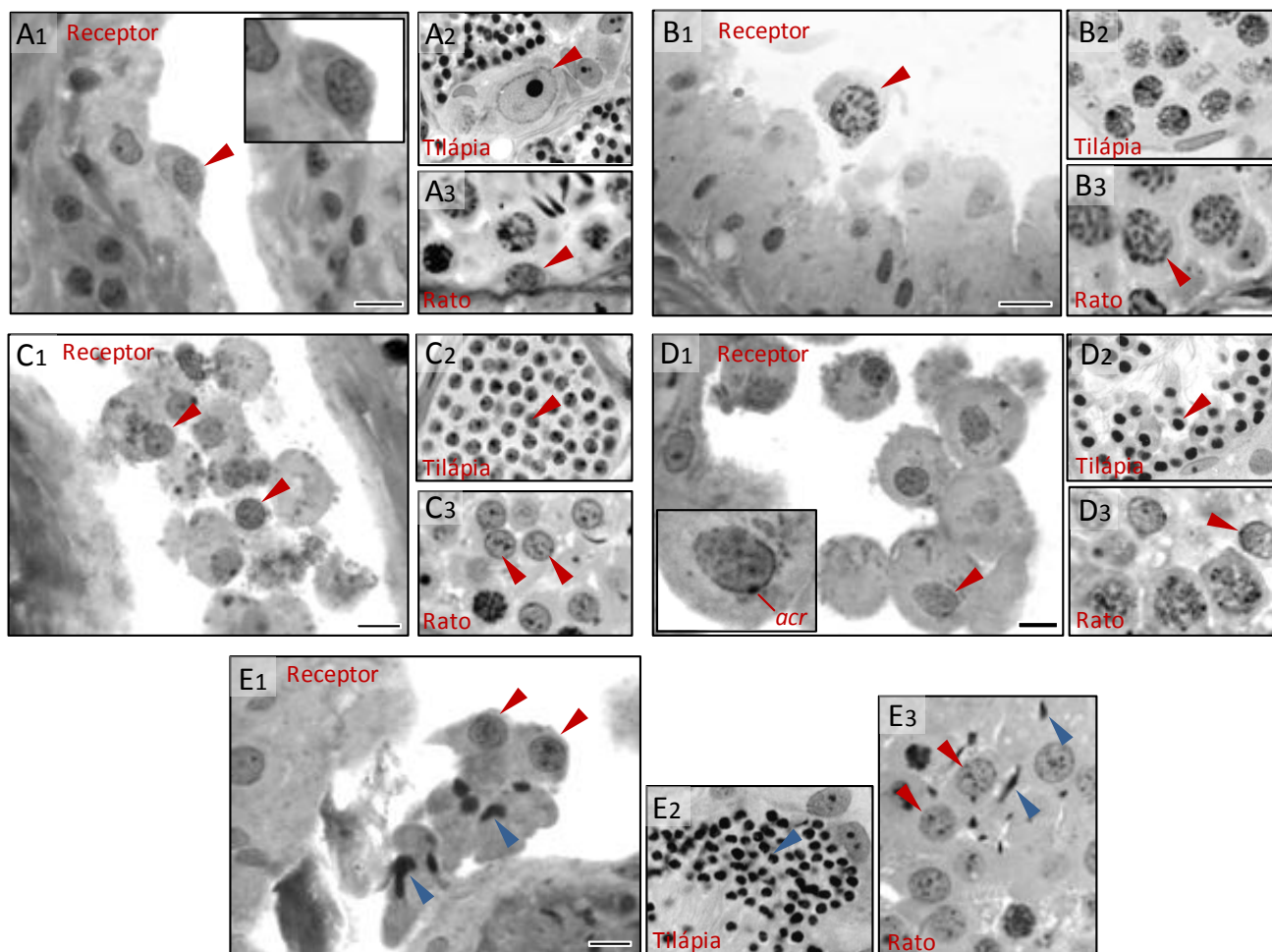


Figura 12. Transplante xenogênico (rato-tilápia). Avaliação histológica, através de microscopia de luz, dos testículos de tilápias 2 semanas (**A1**) e 5 semanas (**B1**, **C1**, **D1**, **E1**) após o transplante de células germinativas de ratos Wistar (impúberes com cerca de 10 dias de idade). Observe, nos túbulos seminíferos das tilápia receptoras, células germinativas de rato em diferentes fases de desenvolvimento (cabeças de setas; **A1**, **B1**, **C1**, **D1**, **E1**) tais como espermatogônia tipo A (**A1** e detalhe desta figura); espermatócito primário na fase de paquíteno (**B1**); espermatídes arredondadas (**C1**); espermatíde com acrossomo (**acr**) (**D1** e detalhe desta figura); espermatídes alongadas (**E1**; cabeças de setas azuis) e espermatócitos secundários (cabeças de setas vermelhas; **E1**). A título de comparação e ilustração, são apresentadas figuras de células germinativas de tilápias (cabeças de setas; **A2**, **B2**, **C2**, **D2**, **E2**) e ratos (cabeças de setas; **A3**, **B3**, **C3**, **D3**, **E3**) em fases semelhantes de desenvolvimento e no mesmo aumento. Observe que as células germinativas de ratos são maiores que as de tilápias. Barra = 10 $\mu$ m.

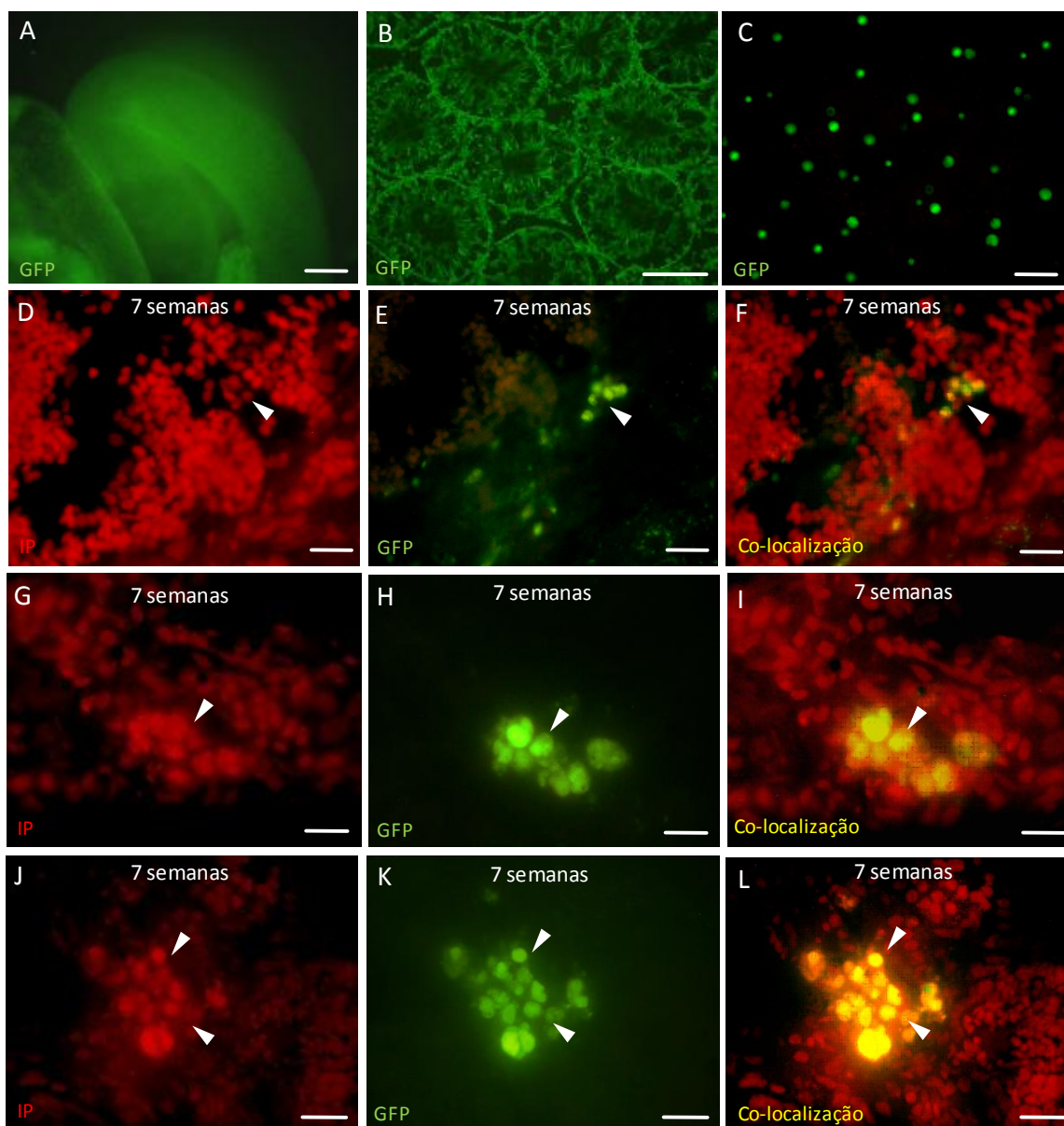


Figura 13. Transplante xenogênico (rato GFP - tilápia). **A e B.** Visualização dos túbulos seminíferos de ratos adultos doadores GFP transgênicos a fresco (**A**) e crioseccionados (**B**) evidenciando a expressão ubíqua da proteína fluorescente verde nos testículos. **C.** Suspensão de células germinativas obtida a partir dos testículos de ratos GFP-transgênicos. **D-L.** Visualização de testículos de tilápias receptoras transplantados com células germinativas de ratos GFP, analisados através de microscopia de fluorescência, 7 semanas pós-transplante. Nas figuras **E, H e K** é possível observar grupos de células germinativas GFP positivas presumivelmente oriundas de espermatogônias de rato (cabeças de setas). Na coluna da esquerda, os mesmos campos podem ser vistos através da marcação nuclear com iodeto de propídio (**D, G, J**), enquanto na coluna da direita a sobreposição das imagens presentes nas outras duas colunas está representada (**F, I, L**). Barra em **A e B**= 125 $\mu$ m; **C**=30 $\mu$ m; **D-F**=10 $\mu$ m; **G-L**=20 $\mu$ m.

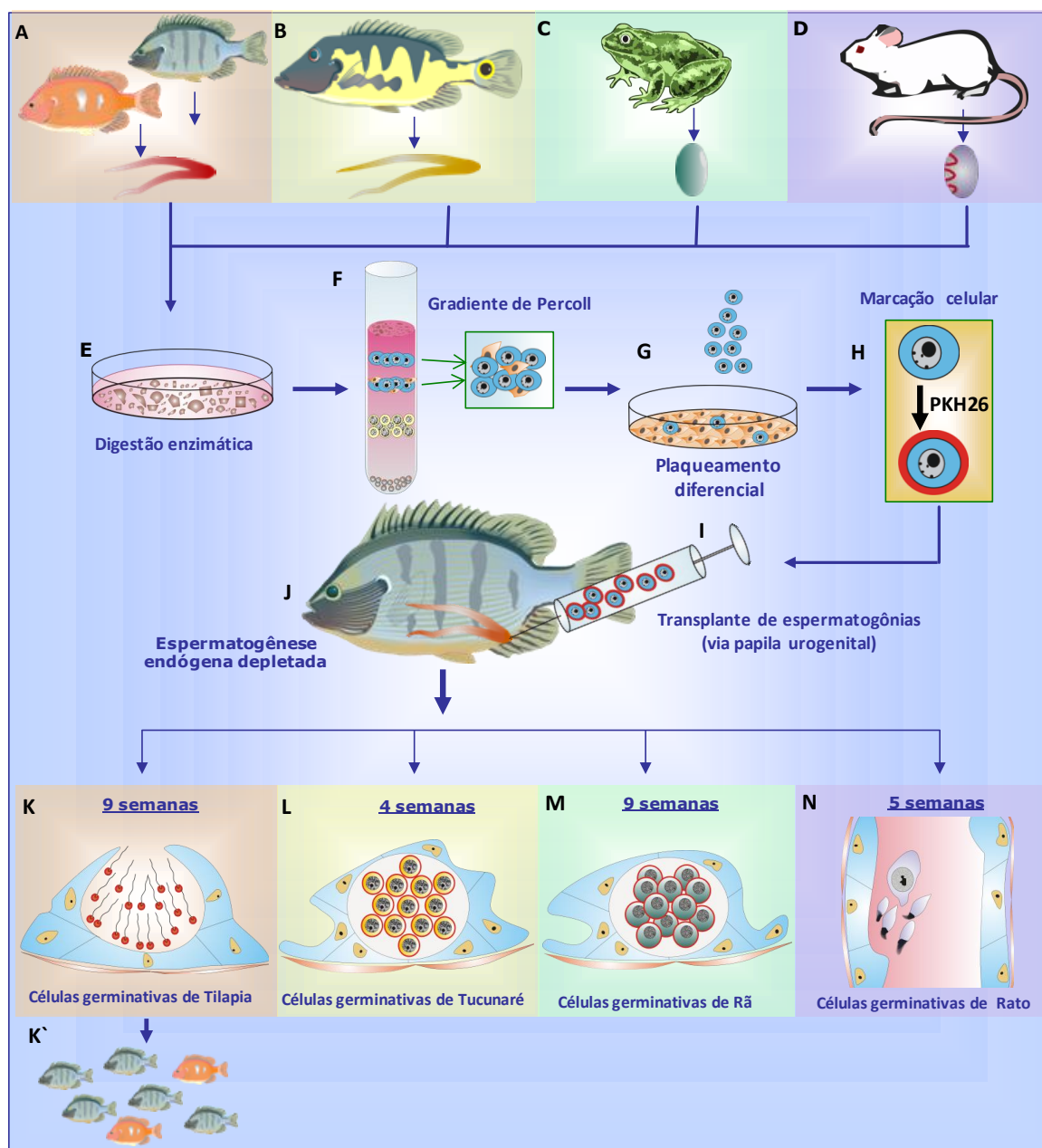


Figura 14. Principais etapas do transplante de células germinativas utilizando-se tilápias sexualmente maduras como receptor. Os testículos dos doadores foram removidos de tilápias (A), tucunarés (B; *C. monoculus*), rãs-touro (C; *L. catesbeianus*) e ratos Wistar (D). Estes testículos foram fragmentados e digeridos com enzimas (E), tais como tripsina, colagenase e DNase. A suspensão celular obtida foi submetida à centrifugação em gradiente de densidade utilizando-se Percoll (F), e ao plaqueamento diferencial (G) com a finalidade de enriquecer a suspensão com espermatogônias indiferenciadas. Como não existem marcadores genéticos disponíveis para as quatro espécies doadoras usadas, o corante fluorescente PKH26 foi utilizado para marcar as espermatogônias (H). Essas células germinativas foram transplantadas através do ducto espermático comum localizado na papila urogenital (I) em tilápias receptoras que tiveram sua espermatogênese endógena previamente depletada (J). Cada receptor recebeu cerca de 1 mL de uma suspensão celular contendo espermatogônias dos doadores. Esses peixes foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo pós-transplante, a fim de se acompanhar o desenvolvimento das células germinativas marcadas com PKH26. Como resultado do transplante singênico observamos que as células germinativas de tilápias

transplantadas colonizaram o testículo receptor e deram origem a espermatozóides férteis 9 semanas após o transplante (**K**) e estes espermatozóides resultaram em uma progênie que apresentava características genéticas dos animais doadores (**K**). No que se refere ao transplante xenogêneo, cistos espermatogênicos de tucunarés (**L**) e rãs (**M**) foram observados, respectivamente, em 4 e 9 semanas após o transplante. Espermátides de ratos Wistar (**N**) foram encontrados nos testículos de tilápias 5 semanas após o transplante.

## 7 – TABELAS

**Tabela 1.** Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante singênico de espermatogônias.

Período pós-transplante	No. de receptores analisados	Testículos com células dos doadores (%)	Testículos com espermatocistos dos doadores(%)
1 hora	4	100.0	NA
14 hora	2	100.0	NA
2 semanas	4	100.0	75.0
3 semanas	3	33.3	33.3
4 semanas	5	60.0	40.0
5 semanas	5	80.0	60.0
6 semanas	6	66.6	66.6
7 semanas	5	100.0	80.0
8 semanas	3	100.0	100.0
9 semanas	3	100.0	100.0

**Tabela 2.** Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante singênico de espermatogônias criopreservadas.

Período pós-transplante	Indivíduo receptor	Testículos com células dos doadores (Colonização)	Testículos com espermatocistos dos doadores
4 semanas	1	Presente	Ausente
8 semanas	2	Presente	Ausente
8 semanas	3	Presente	Presente
9 semanas	4	Ausente	Ausente
10 semanas	5	Presente	Presente
10 semanas	6	Presente	Presente
11 semanas	7	Presente	Presente
11 semanas	8	Presente	Presente

**Tabela 3.** Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante xenogênico de espermatogônias de rãs-touro (*L. catesbeianus*).

Período pós-transplante	Indivíduo receptor	Testículos com células dos doadores (Colonização)	Testículos com espermatocistos dos doadores
1 semanas	1	Presente	Ausente
2 semanas	2	Presente	Ausente
3 semanas	3	Presente	Presente
4 semanas	4	Presente	Presente
4 semanas	5	Presente	Presente
6 semanas	6	Ausente	Ausente
6 semanas	7	Presente	Presente
7 semanas	8	Presente	Presente
8 semanas	9	Presente	Presente

**Tabela 4.** Espermatogênese exógena nos testículos de tilápias-nilóticas após o transplante xenogênico de espermatogônias de ratos Wistar.

Período pós-transplante	Indivíduo receptor	Testículos com células dos doadores (Colonização)	Testículos com grupo de células dos doadores
2 semanas	1	Presente	Ausente
2 semanas	2	Presente	Ausente
5 semanas	3	Presente	Presente
5 semanas	4	Presente	Presente
8 semanas	5 <sup>a</sup>	Presente	Ausente
8 semanas	6 <sup>a</sup>	Presente	Presente

<sup>a</sup> Estes animais receberam células germinativas GFP-positivas.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA FF, KRISTOFFERSEN C, TARANGER GL, SCHULZ RW. 2008. Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*, L): a novel model of cystic germ cell development. *Biol Reprod.* 78: 27-34.
- ALVARENGA ER. 2008. Efeitos de diferentes temperaturas sobre as células germinativas e somáticas do testículo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) adultas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.p112.
- ANDO N, MIURA T, NADER MR, MIURA C, YAMAUCHI K. 2000. A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. *Fisheries Sci* .66: 299-303.
- APONTE PM, DE ROOIJ DG, BASTIDAS P. 2005. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*.64: 1440-1455.
- ARAKI K, ARAKI M, MIYAZAKI J, VASSALLI P. 1995. Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 160-164.
- AVARBOCK MR, BRINSTER CJ, BRINSTER RL. 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Med.* 2: 693-696.
- BART J, GROEN HJ, VAN DER GRAAF WT, HOLLEMA H, HENDRIKSE NH, VAALBURG W, SLEIJFER DT, DE VRIES EG. 2002. An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol*.3: 357-363.
- BATLOUNI SR, NÓBREGA RH, FRANÇA LR. 2008a. Cell junctions in fish seminiferous epithelium. *Fish Physiol Biochem.* 35: 207-17
- BATLOUNI SR, LACERDA SMSN, SILVA RC, REZENDE FM, FRANCA LR. 2008b. Transplanted rat spermatogonia are able to colonize and form elongated spermatids in the Nile tilapia testes. In: Programme and Miniposters book of 15th European Testes Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis. p15.
- BEAMISH FW. 1970. Influence of temperature and salinity acclimation on temperature preference of the euryhaline fish *Tilapia nilotica*. *J Fish. Res. Board Can.* 27:1209-1214.
- BELLGRAU D, DUKE RC. 1999. Apoptosis and CD95 ligand in immune privileged sites. *Int Rev Immunol*.18: 547-62.
- BELLVÉ AR, CAVICCHIA JC, MILLETTE CF, O'BRIEN DA, BHATNAGAR YM, DYM M. 1977. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. *J Cell Biol.* 74: 68-85.
- BILLARD, R. 1969. Spermatogenenèse de *Poecilia reticulata* – estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann. Biol. Anim. Bich. Biophys*.9: 251-271.
- BILLARD R, FOSTIER A, WEIL C, BRETON B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Aquat.* 39: 65-79
- BILLARD R. 1984. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Oecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell Tiss. Res*.237: 219-226.
- BILLARD R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Develop*; 26: 877-920.

- BILLARD R. 1990. Spermatogenesis in teleost fish. In: Lamming Ge. (eds). *Reproduction in the male*. Churchill Livingstone. p 183-212.
- BOETTGER-TONG HL, JOHNSTON DS, RUSSEL LD, GRISWOLD MD, BISHOP CE. 2000. Juvenile spermatogonial depletion (*jsd*) mutant seminiferous tubules are capable of supporting transplanted spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 63: 1185-1191.
- BORGES FILHO OF. 1987. Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultra-estruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo do *Prochilodus scrofa* – Steindachener, 1881. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 233p.
- BORYSHPOLETS S, DZYUBA B, RODINA M, LI P, HULAK M, GELA D, LINHART O. 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology*. 59:291-296.
- BRAYTON, C.F. 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* 76-90.
- BRINSTER RL, AVARBOCK MR. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:11303-7.
- BRINSTER RL, ZIMMERMANN JW. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:11298-302.
- BRINSTER RL, NAGANO M. 1998. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Cell Dev Biol*. 9:401-409.
- BRINSTER RL. 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*. 296: 2174-2176.
- BRINSTER CJ, RYN BY, AVARBOCK MR, KARAGENC L, BRINSTER RL. 2003. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires efficient recipient preparation. *Biol Reprod*. 69: 412 -420.
- BUAAS FW, KIRSH AL, SHARMA M, MCLEAN DJ, MORRIS JL, GRISWOLD MD, DE ROOIJ DG, BRAUN RE. 2004. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 36: 551-553.
- BUCCI LR, MEISTRICH ML. 1987. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities and dominant lethal mutations. *Mutat Res*. 178: 259-68.
- BUNDY DC. 1995. Photographic emulsions and processing. In: Stumpf WE, Solomon HF (eds). *Autoradiography and Correlative Imaging*. San Diego, CA: Academic Press. p 49 –57.
- CAMPOS-SILVA R. 2009. Transplantes singênico e xenogênico de espermatogônias tronco em gatos domésticos (*Felis catus*) adultos. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. p 102.
- CARDOSO E. 2007. Cinética espermatogonial, duração da espermatogênese e eficiência das células de Sertoli em zebrafish (*Danio rerio*) adultos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. p 81.
- CATZEFLIS F, DICKERMAN A, MICHAUX J, KIRSCH J. 1993. DNA Hybridization and rodent phylogeny. In: Szalay F, Novacek M, Mckenna M (eds). *Mammal Phylogeny*. New York, NY: Springer Verlag. p 159-172.
- CELEBI C, AUVRAY P, BENVEGNI T, PLUSQUELLEC D, JÉGOU B, GUILLAUMEUX T. 2002. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following *in vivo* transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev*. 62 : 477-482.
- CHAO NH, LIAO IC. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 197: 161-189.



- CHEN SL, TIAN YS. 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology*. 63:1207–1219.
- CHEN C, OUYANG W, GRIGURA V, ZHOU Q, CARNES K, LIM H, ZHAO GQ, ARBER S, KURPIOS N, MURPHY TL, CHENG AM, HASSELL JA, CHANDRASHEKAR V, HOFMANN MC, HESS RA, MURPHY KM. 2005. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 436:1030-1034.
- CHIARINI-GARCIA H, HORNICK JR, GRISWOLD MD, RUSSELL LD. 2001. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod*. 65: 1179-85.
- CHIARINI-GARCIA H, RAYMER AM, RUSSELL LD. 2003. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*. 126: 669-80.
- CHU C, SCHMIDT JJ, CARNES K, ZHANG Z, KONG HJ, HOFMANN MC. 2009. Three-dimensional synthetic niche components to control germ cell proliferation. *Tissue Eng Part A*. 15:255-62.
- CIRUNA B, WEIDINGER G, KNAUT H, THISSE B, THISSE C, RAZ E, SCHIER AF. 2002. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 14919-14924.
- CLOUTHIER DE, AVARBOCK MR, MAIKA SD, HAMMER RE, BRINSTER RL. 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*. 381: 418-21.
- COOKE PS, HESS RA, SIMON L, SCHLESSER HN, CARNES K, TYAGI G, HOFMANN M-C, MURPHY KM. 2006. The transcription factor ets-related molecule (ERM) is essential for spermatogonial stem cell maintenance and self-renewal. *Animal Reproduction*. 3:98-107.
- CREEMERS LB, MENG X, DEN OUDEN K, VAN PELT AM, IZADYAR F, SANTORO M, SARIOLA H, DE ROOIJ DG. 2002. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod*. 66: 1579-84.
- CUPP AS, SKINNER MK. 2005. Embryonic Sertoli Cell Differentiation. In: *Sertoli Cell Biology* (eds). MD Griswold and MK Skinner, Elsevier -Academic Press, San Diego, CA, p. 43-70.
- DE ROOIJ DG, RUSSELL LD. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*. 21:776-98.
- DE ROOIJ DG, SCHRANS-STASSEN BHGJ, VAN PELT AMM, SHUTTLESWORTH GA, MEISTRICH ML, OKABE M AND NISHIMUNE Y. 2000. Regulation of the differentiation of the undifferentiated spermatogonia. In *The Testis: From Stem Cell to Sperm Function*. E Goldberg (eds). Springer Verlag, New York. p 43–54
- DE ROOIJ DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 121: 347-54.
- DE ROOIJ DG. 2006a. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box. *PNAS* 103(21):7939-7940.
- DE ROOIJ DG. 2006b. Regulation of spermatogonial stem cell behavior in vivo and in vitro. *Animal Reproduction* 3(2):130-134.
- DE ROOIJ DG, REPPING S, VAN PELT AMM. 2008. Role for adhesion molecules in the spermatogonial stem cell niche. *Cell Stem Cell* 3: 467-468.
- DE RUITER-BOOSTSMA AL, KRAMER MF, DE ROOIJ DG, DAVIS JAG. 1977. Survival of spermatogonial stem cell in the mouse after split-dose irradiation with fission neutrons of 1-MeV mean energy or 300 kV X RAYS. *Radiat. Res*. 71: 579-592.
- DIRAMI G, RAVINDRANATH N, ACHI M, DYM M. 2001. Expression of notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *J Androl* 22: 944–952.

- DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 1999. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* .61:1331-39.
- DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2000. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev*. 57:270-279.
- DOBRINSKI I, OGAWA T, AVARBOCK MR, BRINSTER, RL. 2001. Effect of the GnRH-agonist leuprolide on colonization of recipient testes by donor spermatogonial stem cells after transplantation in mice. *Tiss Cell*. 33: 200-207.
- DOBRINSKI I. 2005a. Transplantation. In: Skinner Mk, Griswold Md.(eds). *The Sertoli cell biology*. p417-485.
- DOBRINSKI I. 2005b. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci.*, 89: 137-45.
- DOBRINSKI I. 2006. Transplantation of germ line stem cells for the study and manipulation of spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 60:1 75-93.
- DOBRINSKI I. 2007. Transplantation of germ cells and testis tissue for the study and preservation of fertility. In: Roldan ERS and Gomendio M (eds.) *Spermatology*. Society for Reproduction and Fertility volume 65, Nottingham University Press, Nottingham, Uk. p447-458.
- DOBRINSKI I. 2008. Male germ cell transplantation. *Reprod Domest Anim*. 2:288-94.
- EDDY EM. 1999. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev. Reprod*. 4: 23-30.
- EHMCKE J, WISTUBA J, SCHLATT S. 2006a. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Human Reproduction Update*. 12: 275-282.
- EHMCKE J, HÜBNER K, SCHÖLER HR, SCHLATT S. 2006b. Spermatogonia: origin, physiology and prospects for conservation and manipulation of male germ line. *Reprod Fertil Dev*. 18:7-12.
- EWING HH. 1972. Spermatogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Anat Rec*. 172:308.
- FAO. 2007. Cultured Aquatic Species Information Programme. Fisheries and Aquaculture Department. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en). Accessed 2010 Feb 8.
- FERREIRA ME, GRATTAPAGLIA D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20).
- FIJAK M, MEINHARDT A. 2006. The testis in immune privilege. *Immunol Rev*. 213: 66-81.
- FITZSIMMONS K. 2000. Tilapia aquaculture in the Americas. In: Costa Pierce Ba, Rackoy (eds.). Baton Rouge: *World Aquaculture Society*. p.100-118.
- FRANÇA LR, RUSSELL LD. 1998. The testis of domestic animals. In: Male Reproduction. Martínez-García F, Regadera J (eds). Churchill Livingstone, Madrid, Spain. p197-219.
- FRANÇA LR, RUSSELL LD. 2000. Spermatogonial transplantation in mammals. *Arbs Ann Rev Biomed Sci*. 2: 61-76.
- FRANÇA LR, CHIARINI-GARCIA H. 2005. Célula de Sertoli. In: CARVALHO HF, COLLARES-BUZATO, CB (eds.). *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri, SP: Manole. p302-324.
- FUCHS E, TUMBAR T, GUASCH G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769-778.

- FUJITA K, OHTA H, TSUJIMURA A, TAKAO T, MIYAGAWA Y, TAKADA S, MATSUMIYA K, WAKAYAMA T, OKUYAMA A. 2005. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest.* 115:1855-1861.
- GARCÍA-LÓPEZ A, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ G, SARASQUETE C. 2005. Male reproductive system in senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. *Histol Histopathol.* 20:1179-89.
- GRIER HJ. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: *The Sertoli Cell.* Russell LD, Griswold MD (eds.). Clearwater: Cache River Press. p 703-739.
- GIULI G, TOMLJENOVIC A, LABRECQUE N, OULAD-ABDELGHANI M, RASSOULZADEGAN M, CUZIN F. 2002. Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. *Embo Rep.* 3: 753 -759.
- GOMIERO LM, BRAGA FMS. 2003. Pesca experimental do tucunaré, gênero *Cichla* (Osteichthyes, Cichlidae), no reservatório da UHE de Volta Grande, Rio Grande. *B. Inst. Pesca, São Paulo.* 29: 29-37.
- GOW A, SOUTHWOOD CM, LI JS, PARIALI M, RIORDAN GP, BRODIE SE, DANIAS J, BRONSTEIN JM, KACHAR B, LAZZARINI RA. 1999. CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in OSP/claudin-11 null mice. *Cell.* 99: 649-659.
- GRIER HJ. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russell LD & Griswold MD (eds.). *The Sertoli cell.* Clearwater, FL: Cache River Press. p703-739.
- GRISWOLD MD, MCLEAN D, RUSSELL LD. 2001. Promise and limitations of germ cell transplantation in the testis. *J Androl.* 22: 713-7.
- GUILLAUMEUX T, CELEBI C, AUVRAY P, JÉGOU B. 2000. Genetic manipulation and transplantation of male germ cells. In: testis, epididymis and technologies in the year 2000. Jégou B, Pineau C, Saez J (eds). Springer, Berlin.p 59-68.
- HAIGO K, YAMAUCHI Y, YAZAMA F, YANAGIMACHI R, HORIUCHI T. 2004. Full-term development of hamster embryos produced by injection of round spermatids into oocytes. *Biol. Reprod.* 71:194-198
- HAMRA FK, GATLIN J, CHAPMAN KM, GRELLHESL DM, GARCIA JV, HAMMER RE, GARBES DL. 2002. Production or transgenic rats by lentiviral transduction of male germ line stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 99: 14913-14936.
- HATANAKA T, HENRIQUE-SILVA F, GALETTI PM. 2002. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenet. Genome. Re.* 98: 308-310.
- HAYASHI T, KAGEYAMA Y, ISHIZAKA K, XIA G, KIHARA K, OSHIMA H. 2001. Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J Androl.* 22, 999–1011.
- HAYASHI T, YAMADA T, KAGEYAMA Y, NEGISHI T, KIHARA K. 2004. Expression failure of the Notch signaling system is associated with the pathogenesis of maturation arrest in male infertility patients. *Fertil Steril.* 81, 697-699.
- HE Z, JIANG J, HOFMANN M, DYM M. 2007. Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol Reprod.* 77:723-733.
- HE Z, JIANG J, KOKKINAKI M, GOLESTANEH N, HOFMANN MC, DYM M. 2008. Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells.* 26:266-278.

- HERMANN BP, SUKHWANI M, LIN CC, SHENG Y, TOMKO J, RODRIGUEZ M, SHUTTLEWORTH JJ, MCFARLAND D, HOBBS RM, PANDOLFI PP, SCHATTEEN GP, ORWIG KE. 2007. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells*. 25:2330-8.
- HERRID M, VIGNARAJAN S, DAVEY R, DOBRINSKI I, HILL JR. 2006. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction*. 132: 617–624.
- HESS RA, COOKE PS, HOFMANN M-C, MURPHY KM. 2006. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle*. 5: 1164-1170.
- HIGAKI S, MOCHIZUKI K, BABA H, AKASHI Y, YAMAHA E, KATAGIRI S, TAKAHASHI Y. 2009. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jpn J Vet Res*. 57:119-28.
- HILL JR, DOBRINSKI I. 2006. Male germ cell transplantation in livestock. *Reprod Fertil Dev*. 18: 13-18.
- HOAR WS. 1969. Reproduction. In: HOAR, WS & RANDAL, DJ (EDS.). *Fish Physiology*. New York: Academic Press. v. 111, cap. 1.
- HOFMANN MC. 2008. GDNF signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol*. 25: 95-103.
- HONARAMOOZ A, MEGEE SO, DOBRINSKI I. 2002a. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*. 66: 21-28.
- HONARAMOOZ A, SNEDAKER A, BOIANI M, SCHÖLER H, DOBRINSKI I, SCHLATT S. 2002b Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*. 418: 778-81.
- HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, BLASH S, MEGEE SO, DOBRINSKI I. 2003a. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev*. 64: 422-428.
- HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, MEGEE SO, OVERTON SA, GALANTINO-HOMER HL, ECHELARD Y, DOBRINSKI I. 2003b. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats, *Biol. Reprod*. 69: 1260–1264.
- HONARAMOOZ A, MEGEE SO, FOLEY B, DOBRINSKI I. 2003c . Use of adeno-associated virus for transfection of male germ cells for transplantation in pigs, *Theriogenology* 59: 536.
- HONARAMOOZ A, LI MW, PENEDO CT, MEYERS AS, DOBRINSKI I. 2004. Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice. *Biol Reprod*. 70: 1500-1503.
- HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, HAUSLER CL, BLASH S, AYRES S, AZUMA C, ECHELARD Y, DOBRINSKI I. 2005. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J. Androl*. 26: 698-705.
- HUANG C, SUN C, SU X, ZHAO X, MIAO M, LIU Y, DONG Q. 2009. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies--a generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae. *Cryobiology*. 59:351-356.
- IZADYAR F, DEN OUDEN K, STOUT TA, STOUT J, CORET J, LANKVELD DP, SPOORMAKERS TJ, COLENBRANDER B, OLDENBROEK JK, VAN DER PLOEG KD, WOELDERS H, KAL HB, DE ROOIJ DG. 2003. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 126: 765-74
- JOHNSTON DS, RUSSELL LD, FRIEL PJ, GRISWOLD MD. 2001. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology*. 142: 2405-2408.

KANATSU-SHINOHARA M, KATO M, TAKEHASHI M, MORIMOTO H, TAKASHIMA S, CHUMA S, NAKATSUJI N, HIRABAYASHI M, SHINOHARA T. 2008. Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biol Reprod.* 79:1121-8.

KAWAMOTO S, NIWA H, TASHIRO F, SANO S, KONDOH G, TAKEDA J, TABAYASHI K, MIYAZAKI J. 2000. A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett.* 470: 263-8.

KHAIRA H, MCLEAN D, OHL DA, SMITH GD. 2005. Spermatogonial stem cell isolation, storage, and transplantation. *J Androl.* 26:442-50

KIM Y, SELVARAJ V, DOBRINSKI I, LEE H, MCENTEE MC, TRAVIS AJ. 2006. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. *J Androl.* 27:248-256.

KIM Y, TURNER D, NELSON J, DOBRINSKI I, MCENTEE M, TRAVIS AJ. 2008. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in dog. *Reproduction.* 136: 823-831.

KOBAYASHI T, TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G, TAKEUCHI T. 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 479-480. 2003

KOBAYASHI T, TAKEUCHI Y, TAKEUCHI T, YOSHIZAKI G. 2006. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol Reprod Dev.* 74:207-213.

KOH K-B, KOMIYAMA M, TOYAMA Y, ADACHI T, MORI C. 2004. Percoll fractionation of adult mouse spermatogonia improves germ cell transplantation. *Asian J. Androl.* 6: 63-98.

KOSTEREVA N, HOFMANN MC. Regulation of the Spermatogonial Stem Cell Niche *Reprod Dom Anim.* 3: 386–392.

KOULISH S, KRAMER CR, GRIER HJ. 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol.* 254:292-311.

KUBOTA H, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2003. Spermatogonial stem cell share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 6487-6492.

KUROHMARU M, KANAI Y, HAYASHI Y. 1992. Cytological and cytoskeletal comparison of Sertoli cells without germ cells and those with germ cells using the w/w<sup>v</sup> mutant mouse. *Tiss Cell.* 24:895-903.

LACERDA SMSN. 2006. Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte, MG. p 61.

LACERDA SMSN, BATLOUNI SR, SILVA SBG, HOMEM CSP, FRANÇA LR. 2006. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Animal Reproduction.* 3: 146-159.

LACERDA SMSN, BATLOUNI SR, ASSIS LH, RESENDE FM, CAMPOS-SILVA SM, SILVA RC, SEGATELLI TM, FRANÇA LR. 2008. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybiurn, Intern J Ichthyol.* 32: 115-118.

LARDELLI M, DAHLSTRAND J, LENDAHL U. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev.* 46: 123–136.

LE GAC F, LOIR M. 1999. Male reproductive system, fish. In: Knobil E, Neill Jd (eds). *Encyclopedia of Reproduction.* San Diego: Academic Press. 3: 20-30.

LE GAC F, LOIR M. 1999. Male reproductive system, fish. In: KNOBIL E & NEILL JD (eds). *Encyclopedia of Reproduction.* San Diego, CA: Academic Press, vol 3. p 20-30.

- LEAL MC, CARDOSO ER, NÓBREGA RH, BATLOUNI SR, BOGERD J, FRANÇA LR, SCHULZ RW. 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol Reprod.* 81:177-87.
- LEIBO SP. 1981. Preservation of ova and embryos by freezing. In: Brackett BG, Seidel Jr GE, Seidel SM (eds). *New technologies in animal breeding*. New York: Academic Press. p. 127-39.
- LIN S, LONG W, CHEN J, HOPKINS N. 1992. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 4519-4523.
- LOIR M, SOURDAINE P, MENDIS-HANDAGAMA SM, JÉGOU B. 1995. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc Res Tech.* 32: 533-552.
- LOVSHIN LL, CYRINO PEP. 1998. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes, 2.ed, Piracicaba. *Anais*. Campinas: CBNA, p. 1-20.
- LUCAS B, FIELDS C, HOFMANN MC. 2009. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 87: 35-42.
- LUI WY, CHENG CY. 2007. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis: a molecular and biochemical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18: 299-311.
- LUO J, MEGEE S, RATHI R, DOBRINSKI I. 2006. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Molecular Reproduction and Development.* 73: 1531-1540
- MAHATO D, GOULDING EH, KORACH KS, EDDY EM. 2000. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- $\alpha$  for development or function. *Endocrinology.* 141:1273-75.
- MAINARDES-PINTO CSR, VERANI JR, ANTONIUTTI DM. 1995. Estudo comparativo do crescimento de machos de *Oreochromis niloticus* em diferentes períodos de cultivo. *Boletim Do Instituto de Pesca.* 22: 73-87.
- MAJHI SK, HATTORI RS, YOKOTA M, WATANABE S, STRÜSSMANN CA. 2009. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germlines. *PLoS One.* 4:E6132.
- MATTA SL, VILELA DA, GODINHO HP, FRANÇA LR. 2002. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology.* 143: 970-978.
- MATTEI X, SIAU Y, THIAW OT, THIAM D. 1993. Peculiarities in the organization of testis of *ophidion* sp. (pisces, teleostei). Evidence of two types of spermatogenesis in teleost fish. *J. Fish. Biol.* 43, 931-937.
- MAZUR P, RALL WF, LEIBO SP. 1984. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys.* 6: 197-213.
- MAZUR P. 2004. Principles of cryobiology. In: Lane N, Fuller BJ, Benson EE (eds). *Life in the frozen state*. Boca Raton, FL: CRC Press. p.3-65.
- MCLEAN D, RUSSELL LD, GRISWOLD MD. 2002. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin a-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod.* 66:1374-1379.
- MCLEAN D. 2005. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res.* 322:21-31.

- MEISTRICH ML, VAN BEEK MEAB. 1993. Spermatogonial stem cells: assessing their survival and ability to produce differentiated cells. IN: *Methods in Toxicology*. Chapin RE and Heindel J (eds). Academic Press, New York. p 106–123.
- MEISTRICH ML, SHETTY G. 2003. Inhibition of spermatogonial differentiation by testosterone. *J Androl* 24:135-148.
- MIKKOLA M, SIRONEN A, KOPP C, TAPONEN J, SUKURA A, VILKKI J, KATILA T, ANDERSSON M. 2006. Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. *Reprod Dom Anim*. 41:124-128
- MINTZ B, RUSSELL ES. 1957. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J. Exp. Zool*. 134: 207-238.
- MIURA T. 1999. Spermatogenic cycle in fish. In: Knobil, E., Neill, J.D. (eds). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press. v4. p 571-578.
- MIURA T, MIURA C, KONDA Y, YAMAUCHI K. 2002. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 129:2689-2697.
- MIURA T, MIURA CI. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol Biochem* 28:181-186.
- MIURA T, OHTA T, MIURA CI, YAMAUCHI K. 2003. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144:5504-5510.
- MIURA C, KUWAHARA R, MIURA T. 2006. Transfer of spermatogenesis-related cDNAs into eel testis germ-somatic cell coculture pellets by electroporation: methods for analysis of gene function. *Mol Reprod Dev*. 74:420-427.
- MOISAN AE, FOSTER RA, BETTERIDGE KJ, HAHNEL AC. 2003. Dose-response of  $rag2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$  mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction*. 126: 205 -216.
- MORROW CM, TYAGI G, SIMON L, CARNES K, MURPHY KM, COOKE PS, HOFMANN MC, HESS RA. 2009. Claudin 5 expression in mouse seminiferous epithelium is dependent upon the transcription factor ets variant 5 and contributes to blood-testis barrier function. *Biol Reprod*. 81:871-879
- NAGANO M, AVARBOCK MR, LEONIDA EB, BRINSTER CJ, BRINSTER RL. 1998. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tiss Cell*. 30:389-397.
- NAGANO M, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 1999. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Reprod*. 60: 1429-1436.
- NAGANO M, MCCARREY JR, BRINSTER RL. 2001a. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol Reprod*. 64:1409-1416.
- NAGANO M, BRINSTER CJ, ORWIG KE, RYU BY, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2001b. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.98: 13090-13095.
- NAGANO M, PATRIZIO P, BRINSTER LR. 2002b. Long term survival of human spermatogonial stem cell in mouse testes. *Fertil. Steril*. 78: 1225-1233.
- NAGANO M, RYU BY, BRINSTER CJ, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2003. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod*. 68: 2207-2214.
- NAKAGAWA T, NABESHIMA Y, YOSHIDA S. 2007. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell*. 12: 195-206.

- NASCIMENTO HF, DRUMOND AL, DE FRANÇA LR, CHIARINI-GARCIA H. 2009. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int J Androl.* 32: 486-497
- NASR IW, WANG Y, GAO G, DENG S, DIGGS L, ROTHSTEIN DM, TELLIDES G, LAKKIS FG, DAI Z. 2005. Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells. *J Immunol.* 174: 6161-6168.
- NELSON JS. 1994. *Fishes of the World*, 3.ed., New York, John Wiley & Sons, 523p.
- NELSON RJ, BEACHAM TD, SMALL MP. 1998. Microsatellite analysis of the population structure of a vancouver island sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stock complex using nondenaturing gel electrophoresis. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 7: 312-319
- NÓBREGA RH. 2006. Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacepede, 1803). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Campinas. Campinas SP. p 185.
- NÓBREGA RH, BATLOUNI SR, FRANÇA LR. 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem.* 35: 197-206.
- OATLEY JM, AVARBOCK MR, TELARANTA AI, FEARON DT, BRINSTER RL. 2006. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *PNAS.* 103:9524-9529.
- OATLEY JM, BRINSTER RL. 2008. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24: 263-286.
- OGAWA T, ARÉCHAGA JM, AVARBOCK MR, BRINSTER LR. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol.* 41:111-122.
- OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 1998. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. *Tissue Cell.* 30: 583-588
- OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 1999. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod.* 60:515-21.
- OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2000. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Med.* 6:29-34.
- OHTA H, SAKAIDE Y, WAKAYAMA T. 2009. Functional analysis of male mouse haploid germ cells of various differentiation stages: early and late round spermatids are functionally equivalent in producing progeny. *Biol. Reprod.* 80: 511-517.
- OHTA H, YOMOGIDA K, YAMADA S, OKABE M, NISHIMUNE Y. 2000. Real-time observation of transplanted 'green cells': proliferation and differentiation of stem cells. *Dev Growth Differ.* 42:105-12.
- OHTA H, WAKAYAMA T. 2004. Full-term development of offspring using round spermatids produced ectopically from fetal male germ cells. *J Reprod Dev.* 50: 429-437.
- OKUTSU T, SUZUKI K, TAKEUCHI Y, TAKEUSHI T, YOSHISAKI G. 2006a. Testicular germ cell can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *PNAS.* 103: 2725-2729.
- OKUTSU T, YANO A, NAGASAWA K, SHIKINA S, KOBAYASHI T, TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G. 2006b. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J Reprod Dev.* 52: 685-693.



- OKUTSU T, SHIKINA S, KANNO M, TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*. 317:1517.
- ORWING KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2002a. Retrovirus- mediated modification of male germline stem cell in rats. *Biol. Reprod.* 64:874-879.
- ORWING KE, SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2002b. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. *Biol. Reprod.* 66:944-949.
- ORWING KE, SCHLATT S. 2005. Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue preservation of male fertility. *J National Cancer Institute Monographs*. p51-56.
- PARENTI LR, GRIER HJ. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44: 333-348.
- PARREIRA GG, OGAWA T, AVARBOCK MR, FRANÇA LR, BRINSTER RL, RUSSELL LD. 1998. Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod.* 59: 1360-1370.
- PATTERSON C. The caudal skeleton in lower pholidophorid fishes. 1968. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Geol.* 16: 201-239.
- PATTERSON C, ROSEN DE. 1977. Review of ichthyodectiform and other Mezoic teleost fishes and the theory and practice of classfying fossils. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 158: 81-172.
- PUDNEY J. 1993. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: RUSSELL LD & GRISWOLD MD (eds). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press. p 611-657.
- PUDNEY J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. 1995. *Microsc. Res. Tech.* 6: 459-497.
- QUAGIO-GRASSIOTO I, CARVALHO ED. 1999. The ultrastructure of sorubim lima (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tiss. Cell.* 31: 561-567.
- RATHI R, HONARAMOOZ A, ZENG W, TURNER R, DOBRINSKI I. 2005. Testis tissue xenografting as a bioassay for germ cell developmental potential in equine cryptorchid testes. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 28
- REIS MM, TSAI MC, SCHLEGEL PN, FELICIANO M, RAFFAELLI R, ROZENWAKS Z, PALERMO GD. 2000. Xenogeneic transplantation of human spermatogonia. *Zigote.* 8: 97-105
- RODRIGUEZ-SOSA JR, DOBSON H, HAHNEL A. 2006. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology.* 66: 2091–2103.
- RODRIGUEZ-SOSA JR, DOBRINSKI I. 2009. Recent developments in testis tissue xenografting. *Reproduction.* 138: 187-194
- RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Fl. 286p.
- RUSSELL LD, GRISWOLD MD. 1993. The Sertoli cell. Cache River Press, Clearwater, 801p.
- RUSSELL LD, FRANÇA LR, BRINSTER RL. 1996. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J Androl.* 17:603-14.
- 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. *Biol. Reprod.* 78: 159-166.

- SAITOU M, FURUSE M, SASAKI H, SCHULZKE JD, FROMM M, TAKANO H, NODA T, TSUKITA S. 2000; Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 11: 4131- 4142.
- SAKAMOTO T, DANZMANN RG, GHARBI K, HOWARDA P, I OZAKIC A, KHOOC SK, WORAMA RA, OKAMOTOC N, FERGUSONA MM, HOLMD LE, GUYOMARDB R, HOYHEIME B. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates *Genetics*. 155:1331-1345.
- SATO Y, FENERICH-VERANI N, NUNER APON, GODINHO HP, VERANI JR. 2003. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO HP & GODINHO AL (eds). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais, Belo Horizonte, CNPq/PADCT, Editora PUC Minas. p 468.
- SCHLATT S, ROSIEPEN G, WEINBAUER GF, ROLF C, BROOK PF, NIESCHLAG E. 1999. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod*. 14:144-150.
- SCHLATT S, FOPPIANI L, ROLF C, WEINBAUER GF, NIESCHLAG E. 2002. Germ cell transplantation into x-irradiated monkey testes. *Hum Reprod*. 17: 55-62.
- SCHLATT S, HONARAMOOZ A, BOIANI M, SCHÖLER HR, DOBRINSK I. 2003. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod*. 68: 2331-2335.
- SCHULZ RW, MIURA T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 26:43-56.
- SCHULZ RW. 2003. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. *ARBS Annu Rev Biomed Sci* 5:57-68.
- SCHULZ RW, MENTING S, BOGERD J, FRANCA LR, VILELA DA, GODINHO HP. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis—evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod*. 73:891-8.
- SCHULZ RW, FRANÇA LR, LAREYRE JJ, LEGAC F, CHIARINI-GARCIA H, NOBREGA RH, MIURA T. 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol*. 165: 390-411.
- SEEHAUSEN O, VAN ALPHEN JM, WITTE F. 1997. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* 277: 1808-1811.
- SEIDEL GE JR. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 65:228-35.
- SHAFLAND PL. 1996 An overview of Florida's introduced butterfly peacock bass (*Cichla monoculus*) sportfishery. *Natura Caracas*. 96: 26-29.
- SHARPE RM. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E, NEILL JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p 1363-1434.
- SHIKINA S, IHARA S, YOSHIZAKI G. 2008. Culture conditions for maintaining the survival and mitotic activity of rainbow trout transplantable type A spermatogonia. *Mol Reprod Dev*. 75: 529-537.
- SETCHELL BP. 1998. Heat and the testis. *J. Reprod. Fertil*. 114: 179-194.
- SHIMIZU A. 2003. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocr*. 131: 310-324.
- SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 1999.  $\beta_1$ - and  $\alpha_6$ -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 5504-5509.
- SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2000. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. *Dev Biol*. 220: 401-11.

- SHINOHARA T, BRINSTER RL. 2000. Enrichment and transplantation of spermatogonial stem cells. *Int J Androl.* 23:89-91.
- SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2001. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 6186-6191.
- SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2002. Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes. *Biol Reprod.* 66:1491-1497.
- SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. 2003. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biol Reprod.* 68: 1064-1071.
- SHUTTLESWORTH GA, DE ROOIJ DG, HUHTANIEMI I, REISSMANN T, RUSSELL LD, SHETTY G, WILSON G, MEISTRICH ML. 2000. Enhancement of a spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology.* 141: 37 -49.
- SILVA M, GODINHO HP. 1983. Timing of some events of the gametogenesis in the male Nile tilapia, *Sarotherodon niloticus*. *Arch. Anat. Mic.*72: 231-237
- SILVA M. 1987. Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemotesticular da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 164p.
- SILVA SGB, VILELA DAR, GODINHO HP, FRANÇA L. 2004. Effect of busulfan and temperature in the depletion of endogenous spermatogenesis in sexually mature tilapias. In: 15th International Congress On Animal Reproduction, Porto Seguro. Abstracts committee. v. 1. p 182.
- SMITH A. 2006. A glossary for stem-cell biology. *Nature.* 441: 1060.
- SOJKA EJ, HOPE W, PEARSON D. 1990. Dimethyl Sulfoxide update - new applications and dosing methods. *Proceed. Am. Assoc. Equine Practit.*36: 683-690
- SPRADLING A, DRUMMOND-BARBOSA D, KAI T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* 414:98-104.
- SPRECHER CJ, PUERS C, LINS AM, SCHUMM JW. 1996. A general approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *Biotechniques.* 20:266-276.
- STEPONKUS PL, WEBB MS. 1992. Freeze induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: Somero, GN, Osmond CB & Bolis CL (eds) *Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag. p 338-362.
- STICKNEY RR. 1997. Tilapia update 1996. *World Aquaculture.* 28: 20-25.
- STICKNEY RR. 2000. Tilapia Culture. In: Stickney, R.R. (ed.). *Encyclopedia of Aquaculture*, New York: John Wiley & Sons, p.934-941.
- STONE RW. 1993. Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide. *Canine Pract.* 18: 16-19.
- TAKEUCHI, Y., YOSHIZAKI, G., TAKEUCHI, T. 2001. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 380-389.
- TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G, TAKEUSHI T. 2003. Generation of live fry from intraperitoneally primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod.* 69: 1142-1149.
- TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G, TAKEUSHI T. 2004. Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature.* 430: 629-630.

- TAKEUCHI Y, HIGUCHI K, YATABE T, MIWA M, YOSHIKAZI G. 2009. Development of spermatogonial cell transplantation in Nile croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biol Reprod.* 81:1055-63.
- TEGELENBOSCH RA, DE ROOIJ. 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 290:193-200.
- TREWAVAS E. 1983. Tilapiine: Fishes of The Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum of Natural History, London.
- TOKALOV SV, GUTZEIT HO. 2005. Spermatogenesis in testis primary cell cultures of the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Develop Dyn.* 223:1238-1247.
- TORRANS L. 1998. Blue tilapia culture in arkansas. Pine Bluff: Cooperative Extension Service Program Publication University of Arkansas. EC560.
- TREWEVAS E. 1983. Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *British Museum of Natural History*, Publication Number 878. Comstock Publishing Associates. Ithaca, New York. p 583.
- TURNER CL. 1919. The seasonal cycle in the spermary of the perch. *J. Morph.* 32: 681-711.
- TURNER R, RATHI R, HONARAMOOZ A, ZENG W, DOBRINSKI I. 2005. Germ cell development in equine testis tissue xenografted into mice, *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 283–284.
- UYTTENDAELE H, MARAZZI G, WU G, YAN Q, SASSOON D, KITAJEWSKI J. 1996. Notch4 / int-3, a mammary proto-oncogene is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development.* 122: 2251–2259.
- VAN BEEK M, MEISTRICH M, DE ROOIJ D. 1990. Probability of self-renewing divisions of spermatogonial stem cells in colonies, formed after fission irradiation. *Cell Tissue Kinet.* 23: 1–16.
- VAN DEN AARDWEG GJ, DE RUITER-BOOTSMA AL, KRAMER MF, DAVIDS JA. 1983. Growth and differentiation of spermatogenic colonies in the mouse testis after irradiation with fission neutrons. *Radiat Res.* 94: 447-463.
- VAN DER MEER Y, HUISKAMP R, DAVIDS JA, DE ROOIJ DG. 1993. Differential effects of fractionated X irradiation on mouse spermatogonial stem cells. *Radiat Res.* 135: 222-228.
- VECINO P, URANGA JA, ARECHAGA J. 2001. Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. *Protoplasma.* 217: 191-8.
- VIEIRA MI. 1993. Rã Touro Gigante: Características e Reprodução. 4ed. Infotec. São Paulo, SP. p 80.
- VILELA DAR. 2003. Evolução do processo espermatogênico e investigação da proliferação das células de sertoli e da duração das fases meiótica e espermiogênica da espermatogênese sob diferentes temperaturas, em tilápias-nilóticas (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de mestrado. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 74p.
- VILELA DAR, SILVA SGB, PEIXOTO MTD, GODINHO HP, FRANÇA LR. 2003. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiology And Biochemistry.* 28: 187-190.
- VIVEIROS AT, GODINHO HP. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem.* 35: 137-50.
- VON SCHÖNFELDT V, WISTUBA J, SCHLATT S. 2004. Notch-1, c-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. *Cytogenet Genome Res.* 105: 235-9.

- WANG YB, CHEN B, WANG Z. 2008. Transplantation of spermatogonial stem cells and prospects of its application. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 14: 635-639.
- WEGLARZ TC, SANDGREN EP. 2000. Timing of hepatocyte entry into dna synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *PNAS*. 97: 12595-12600.
- WEINMASTER G. 1997. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 9: 91–102.
- WEINMASTER G, ROBERTS VJ, LEMKE G. 1991. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development*. 113: 199–205.
- WELTZIEN FA, ANDERSSON E, ANDERSEN O, SHALCHIAN-TABRIZI K, NORBERG B. 2004. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry And Physiology - part a: Molecular & Integrative Physiology*. 137: 447-477.
- WITTE F, GOLDSCHMIDT T, WANINK J, VAN OIJEN M, GOUDSWAARD K, WITTE-MAAS E, BOUTON N. 1992. The destruction of an endemic species flock: quantitative data on the decline of the haplochromine cichlids of Lake Victoria. *Environ Biol Fish* 29: 1-28.
- YAN W. 2006. Molecular mechanisms of spermatogonial fate control: lessons from gene knockouts. *Biol Reprod*. 75: 487.
- YANO A, VON SCHALBURG K, COOPER G, KOOP BF, YOSHIZAKI G. 2008a. Identification of a molecular marker for type A spermatogonia by microarray analysis using gonadal cells from pvasa-GFP transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev*. DOI 10.1002/mrd.20947
- YANO A, SUZUKI K, YOSHIZAKI G. 2008b. Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biol Reprod* 78:151-158.
- YAZAWA R, TAKEUCHI Y, HIGUCHI K, YATABE T, KABEYA N, YOSHIZAKI G. 2010. Chub Mackerel Gonads Support Colonization, Survival, and Proliferation of Intraperitoneally Transplanted Xenogenic Germ Cells. *Biol Reprod*. DOI:10.1095/biolreprod.109.081281
- YOSHIDA S, TAKAKURA A, OHBO K, ABE K, WAKABAYASHI J, YAMAMOTO M, SUDA T, NABESHIMA Y. 2004. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol*. 269: 447-58.
- YOSHIDA S, SUKENO M, NABESHIMA Y. 2007. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*. 31: 1722-1726.
- ZHANG XS, ZHAO L, HUA TC, ZHU HY. 1989. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. *Cryo Letters* 10:271–278.
- ZHANG Z, RENFREE MB, SHORT RV. 2003. Successful intra- and interspecific male germ cell transplantation in the rat. *Biol Reprod* 68: 961-967.
- ZHANG Z, SHORT RV, MEEHAN T, DE KRETZER DM, RENFREE MB, LOVELAND KL. 2004. Functional analysis of the cooled rat testis. *J Androl*. 25: 57-68.

## 8- ANEXO

**TRABALHO PUBLICADO:** *A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) model.*

**REVISTA:** PLoS ONE (*from PUBLIC LIBRARY of SCIENCE*).