

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

**TRANSPLANTE DE ESPERMATOGÔNIAS: A TILÁPIA-NILÓTICA
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Mestranda: Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda

Orientador: Luiz Renato de França

Belo Horizonte

2006

SAMYRA MARIA DOS SANTOS NASSIF LACERDA

**TRANSPLANTE DE ESPERMATOGÔNIAS: A TILÁPIA-NILÓTICA
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Biologia Celular da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

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

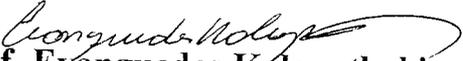
Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG
2006

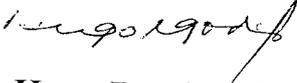
**“Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*)
como modelo experimental”**

Dissertação defendida em 02/03/2006

Resultado: *Aprovada*

Banca Examinadora:


Prof. Evanguedes Kalapothakis
UFMG


Prof. Hugo Pereira Godinho
PUC/MG


Prof. Luiz Renato de França
UFMG (Orientador)

Esta conquista é dedicada a vocês, pai, mãe, Sumaya e Samuel.
Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao professor Luiz Renato de França pela competente orientação, oportunidade e confiança em mim depositada;

Ao professor Hélio Chiarini-Garcia por ter-me introduzido à vida acadêmica e pelas valiosas idéias fornecidas;

Ao Sergio Ricardo pelo constante apoio, carinho e profissionalismo;

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;

Ao professor Ary Corrêa Jr. pela presteza e a todos do Laboratório de Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas;

A professora Walderez Ornelas Dutra e aos alunos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares;

A Estação de Aqüicultura MultiGene, Esmeraldas, MG;

Ao colega Rodrigo Bicalho, pela preciosa ajuda na obtenção e acesso aos animais;

Aos diretores do Condomínio Nossa Fazenda, Esmeraldas, MG;

Aos funcionários do Pesque-Pague Paquinha, Itabira, MG;

Estação de Aqüicultura Geneforte, Pedro Leopoldo, MG;

A professora Gleydes Gambogi Parreira, pelo incentivo e amizade;

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular;

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

As fundações que financiaram o desenvolvimento deste projeto, CAPES, CNPq 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;

Muito obrigada!

Esta dissertação 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. Luiz Renato de França e com o auxílio 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)

“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro e
depois perdem o dinheiro para recuperá-la.
Por pensarem ansiosamente no futuro,
esquecem o presente de tal forma que
acabam por não viver no presente nem no futuro.
Vivem como se nunca fossem morrer
e morrem como se nunca tivessem vivido”.

Confúcio

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Influência da temperatura na duração da espermatogênese.....	43
Figura 2 - Análise histológica e quantitativa dos cistos espermatogênicos presentes nos túbulos seminíferos de tilápias sexualmente maduras.....	44
Figura 3 - Secções longitudinais e transversais de testículos de tilápias tratadas com busulfan e mantidas à 20°C, 25°C, 30°C e 35°C.....	45
Figura 4 - Cortes transversais do testículo de tilápias sexualmente maduras e mantidas a 35°C, visualizados sob microscopias eletrônica de varredura e de luz.....	46
Figura 5 - Influência do tratamento com busulfan e da temperatura nas células de Leydig, em tilápias sexualmente maduras mantidas nas temperaturas de 25°C e de 35°C.....	47
Figura 6 - Separação de células germinativas em gradiente de Percoll.....	48
Figura 7 - Marcação de células germinativas com diferentes concentrações do corante fluorescente PKH26 e diferentes períodos de incubação.....	49
Figura 8 - Disposição e tamanho relativo do ducto uretral e do ducto espermático comum....	50
Figura 9 - Procedimento de injeção da solução contendo o corante vital azul de tripan a 0,4% através do ducto espermático comum e a aparência dos testículos das tilápias adultas sacrificadas após a injeção.....	50
Figura 10 - Testículos das tilápias tratadas com busulfan e mantidas a 35°C observados após o transplante de células germinativas.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1- A tilápia-nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	1
1.2-Estrutura do testículo em teleósteos.....	2
1.3 - Espermatogênese em mamíferos e teleósteos.....	3
1.3.1 - Espermatogênese em mamíferos.....	3
1.3.2 - Espermatogênese em teleósteos.....	4
1.4 - Duração da espermatogênese em mamíferos e teleósteos.....	5
1.5-Transplante de espermatogônias.....	8
1.6- Perspectivas do transplante de espermatogônias.....	13
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 – Animais.....	18
3.2 - Depleção da espermatogênese endógena dos animais receptores.....	20
3.3 - Processamento para análise em microscópio de luz.....	20
3.4 - Processamento para análise em microscopia eletrônica de varredura.....	21
3.5 - Obtenção das células germinativas para o transplante.....	21
3.6 - Marcação das células germinativas dos doadores.....	23
3.7 - Via de Transplante.....	25
3.8 - Transplante de células germinativas e processamento e análise dos testículos transplantados.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 - Depleção da espermatogênese endógena dos animais receptores.....	28
4.2 - Obtenção das células germinativas para o transplante.....	29
4.3 - Marcação das células germinativas dos doadores.....	30
4.4 - Via de Transplante.....	30
4.5 - Transplante de células germinativas.....	31
5. DISCUSSÃO.....	33
5.1 - Animais.....	33
5.2 - Depleção da espermatogênese.....	33
5.3 - Obtenção das células germinativas para o transplante.....	36
5.4 - Marcação das células germinativas dos doadores e via de transplante.....	38
5.5 - Transplante de células germinativas em tilápias.....	40
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	42
7. FIGURAS.....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1- A tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*)

Os teleósteos incluem mais de vinte mil espécies, constituindo, assim, o maior e provavelmente mais diversificado e antigo grupo de vertebrados. O habitat destes vertebrados é bastante variado sugerindo que ao longo de sua história evolutiva os peixes desenvolveram um eficiente diálogo adaptativo com o meio ambiente. Desta forma, os mesmos foram capazes de colonizarem e de se reproduzirem numa variedade muito grande de microambientes (Billard, 1986).

A tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) pertence à ordem Perciformes, família Cichlidae e à sub-família Tilapiinae. 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 espécie de peixe mais produzida no mundo devido às boas características organolépticas de sua carne (Torrans, 1998; FAO, 2003), o que faz da tilápia a espécie mais promissora para a aquicultura do século XXI (Fitzsimmons, 2000). 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.

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, em comparação com os peixes carnívoros cultivados atualmente (Stickney, 2000). As tilápias se caracterizam por apresentarem cuidado parental

bucal desenvolvido pela fêmea (Trewavas, 1983), 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 para as tilápias-nilóticas faz com que as mesmas se apresentem como excelente modelo experimental para se investigar a biologia reprodutiva de peixes teleósteos com alto potencial produtivo (Stickney, 2000).

1.2-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 celomática e à bexiga gasosa 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, delimitando os túbulos seminíferos que apresentam a mesma disposição radiada destes septos. Estes túbulos 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).

A organização básica do testículo é comum a todos os peixes e aos demais vertebrados. Este órgão tem as funções espermatogênica e androgênica, possuindo dois compartimentos principais: o compartimento intersticial e o compartimento tubular. No compartimento intersticial ou intertubular estão situados vasos sanguíneos, fibras nervosas, células e fibras do tecido conjuntivo, além das células de Leydig que possuem função

esteroidogênica. A produção de andrógenos 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). O compartimento tubular contém células somáticas (células de Sertoli) e as células germinativas que irão formar os espermatozóides após passarem por processo bastante complexo e altamente organizado – a espermatogênese (Billard, 1990; Koulisch et al., 2002). 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 que tem origem a partir de uma única espermatogônia primária, formando, assim, os espermatocistos ou cisto espermatogênico. Desta forma, as células de Sertoli fornecem às células germinativas suporte físico e fatores importantes para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das mesmas, estando ainda envolvida na intermediação hormonal e com a fagocitose de restos celulares (Weltzien et al, 2004). 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, diferente dos mamíferos, em peixes as espermatogônias diferenciadas (a partir de espermatogônia primária) não estão em contato com a membrana basal (Billard, 1984).

1.3 - Espermatogênese em mamíferos e teleósteos

1.3.1 - Espermatogênese em mamíferos

O proceso espermatogênico é um evento cíclico complexo, altamente organizado e coordenado, no qual as espermatogônias diplóides se diferenciam em espermatozóides maduros. Durante sua evolução, a espermatogênese pode ser dividida em fases espermatogonial (proliferativa), espermatocitária (meiótica) e espermiogênica (diferenciação). Este processo se inicia com a divisão da espermatogônia tronco, dando origem a outras células germinativas comprometidas com a formação de espermatozóides. Além desta definição funcional (diferenciação e auto-renovação), no testículo de mamíferos as espermatogônias tronco são morfológicamente caracterizadas como as únicas espermatogônias sem pontes intercelulares (De Rooij & Russell, 2000). 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). Até o presente momento, diversos marcadores (positivos

ou negativos) têm sido utilizados com a finalidade de se enriquecer amostras contendo espermatogônias tronco. Dentre estes podem ser citados integrinas β_1^+ e α_6^+ , integrina α_v^- , $CD9^+$, $CD24^+$, $Thy-1^+$, $c-kit^-$, $MHC-I^-$, $Stra\ 8$, Rho^{low} (intensidade baixa de rodamina 123 fluorescente), $Ep-CAM^+$, $EE2^+$ (Shinohara et al., 1999; Kubota et al., 2003; Dobrinski, 2005a; Khaira et al., 2005; McLean, 2005). Porém, ainda não existem marcadores específicos para este tipo celular. No entanto, alguns fatores tais como GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor), GFRalfa-1, o ERM e o Plzf emergem como fortes candidatos na regulação da autorenovação ou diferenciação das espermatogônias tronco em mamíferos (Creemers et al., 2002; Yomogida et al., 2003; Buaas et al., 2004; Buageaw et al., 2005; Chen et al., 2005; Naughton et al., 2006).

Comparada com outros sistemas bem conhecidos de auto-renovação do corpo, a espermatogênese é considerada como um dos que apresentam maior número de divisões celulares durante o seu desenvolvimento. Outro aspecto importante que merece ser ressaltado é que o desenvolvimento e a função do epitélio seminífero estão intimamente relacionados com o desenvolvimento dos elementos somáticos do testículo (França et al., 2000). Desta forma, as células somáticas são os elementos chave para a função normal do sistema genital masculino (Russell et al., 1994), sendo a célula de Sertoli considerada como a mais importante para o desenvolvimento das células germinativas (Russell & Griswold, 1993; Hess et al., 1993, França et al., 1995; Sharpe et al., 2003).

1.3.2 - Espermatogênese em teleósteos

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 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 espermatídes haplóides através da segunda divisão meiótica. Em seguida, ocorre a fase espermiogênica ou de diferenciação na qual as espermatídes se transformam em espermatozóides (Silva, 1987).

As espermatogônias primárias são as maiores células germinativas na maioria das espécies de teleósteos, 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 10 μ m (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 paulistinha (*Brachydanio rerio*; Ewing, 1972) 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. (Vilela, et al., 2003; Schulz et al., 2005).

Recentemente, demonstrou-se que, em bagre-africano (*Clarias gariepinus*) e tilápiá-nilótica já adultos, a medida que o volume do cistos espermatogênicos aumenta, as células de Sertoli sofrem divisão. Essa atividade mitótica é bastante reduzida em cistos meióticos e ausente em cistos pós-meióticos. A proliferação das células de Sertoli é considerada o fator primário responsável pelo aumento do testículo e da produção espermática observado nos teleósteos. Em condições naturais, a proliferação das células de Sertoli no testículo de mamíferos adultos não é observada. (França & Russell, 1998; Schulz et al., 2005).

1.4 - Duração da espermatogênese em mamíferos e teleósteos

Nos mamíferos investigados até o presente momento, a duração da espermatogênese varia de 30 a 75 dias (França & Russell, 1998; França et al., 2005). A duração deste evento é considerada como uma constante biológica espécie-específica que está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). Também é importante ser mencionado que os valores encontrados para a duração da espermatogênese nas espécies de mamíferos investigadas até o presente momento (~1% de aproximadamente 4.000 espécies existentes; Nowak, 1999) sugerem fortemente que fatores filogenéticos não são determinantes para a duração da espermatogênese (França & Cardoso, 1998; Paula et al., 1999; França et al., 1998; França et al., 2005).

Considerando-se o número de espécies de peixes, existem poucos relatos na literatura a respeito da duração dos eventos espermatogênicos nestes vertebrados. No entanto pode ser

evidenciado que de maneira geral a duração da espermatogênese em peixes é bem mais rápida do que o observado para mamíferos (Egami & Hyodo-Taguchi, 1967; De Felice & Rasch, 1969; Billard, 1968; Sinha et al., 1982; Silva & Godinho, 1983; Sinha et al., 1983; Billard, 1990; Koulis et al., 2002, Vilela et al., 2003; França et al., 2005).

Na maioria das espécies de teleósteos os ciclos reprodutivos ocorrem em função de variações das condições ambientais, sendo a temperatura e o fotoperíodo considerados como os dois mais potentes moduladores da atividade reprodutiva (Borg, 1994; Billard, 1986; Shimizu, 2003). Em mamíferos, foi observado que o processo espermatogênico em roedores (camundongos, hamsters e ratos) imaturos progride mais rapidamente do que o de animais adultos (Huckins, 1965; Kluin et al., 1982; Van Haaster & De Rooij, 1993). Pelo fato do descenso testicular ainda não ter ocorrido em animais mais jovens, foi hipotetizado que a aceleração do processo espermatogênico poderia estar relacionada com temperaturas mais elevadas (Kluin et al., 1982; Van Haaster & De Rooij, 1993). Talvez esta hipótese esteja correta, pois, conforme foi encontrado por alguns pesquisadores (Meistrich et al. 1973; França et al., 2005), o processo espermatogênico em camundongos adultos foi mais rápido em animais criptorquídicos ou mantidos em temperatura ambiente mais elevada.

O fato de os peixes serem animais pecilotérmicos (cuja temperatura geralmente está um pouco acima da temperatura ambiente) provavelmente faz com que a duração dos eventos espermatogênicos varie de acordo com a temperatura, sendo mais rápida em temperaturas mais elevadas (Egami & Hyodo-Taguchi, 1967; Billard, 1968; Vilela et al., 2003; França et al., 2005). Particularmente em tilápias-nilóticas, a duração conjunta das fases meiótica e espermiogênica é de 10-11 dias, se os peixes são mantidas à 25°C é de 6-7 dias e 5-6 dias se as tilápias forem mantidas à 30°C e 35°C, respectivamente (Vilela et al, 2003; França et al., 2005). Estes valores são bem menores do que àqueles observados para mamíferos (de três a sete semanas) (França & Russell, 1998; França et al., 2005). De maneira oposta, em tilápias mantidas a 20°C a duração do processo espermatogênico é retardada, ocorrendo uma parada na fase de paquíteno avançado (Vilela et al, 2003).

A seqüência altamente ordenada de eventos através da qual as células eucariotas se reproduzem é denominada de ciclo celular que culmina com a duplicação e divisão de todos os componentes celulares. Este ciclo é tradicionalmente dividido em quatro fases, denominadas seqüencialmente de G1, S, G2 e M, cuja progressão requer coordenada ativação e inativação de proteínas quinases específicas. Nos vertebrados, o início da fase M tanto na mitose quanto na meiose é controlado pelo complexo p34^{cdc2}/ciclina B chamado de MPF (M-phase-promoting factor ou maturation-promoting factor), o qual é regulado pela ciclina A1

após as células terem adquirido a competência para condensar os cromossomos da metáfase I (Cobb et al., 1999; Liu et al., 2000).

Alterações no ciclo celular podem estar relacionadas com mudanças no ritmo de progressão das células germinativas. Como exemplo pode ser citado que o tratamento de camundongos deficientes em ciclina A1 com o ácido okadáico é capaz de contrapor a parada na meiose de paquítenos avançados ou de acelerar a meiose, após a ocorrência do pareamento de cromossomas homólogos em espermatócitos em paquíteno mantidos em cultura (Cobb et al., 1999; Liu et al., 2000). Ainda como exemplos de situações que podem alterar a progressão celular pode ser citado o aumento na síntese de ciclinas D1, quando ocorre aumento na temperatura corporal em ratos (Han et al., 2002), e a parada na meiose de espermatócitos em estágio de paquíteno avançado (na fase G2-M) em camundongos com mutação gênica para a proteína Hsp70-2 (Heat-shock protein) (Eddy, 2002). Conforme é sabido, a Hsp70-2 é requerida para a ativação da Cdc2 quinase que regula o ciclo celular na transição G2-M, sendo esta última controlada pela MPF (Cobb et al., 1999; Liu et al., 2000; Eddy, 2002).

No nosso conhecimento, não existem dados na literatura a respeito dos mecanismos detalhados de regulação fina da progressão da meiose em teleósteos. No entanto, os poucos dados disponíveis na literatura para mamíferos permitem inferir que as alterações no ritmo de progressão das células germinativas podem estar relacionadas com mecanismos de regulação do ciclo celular que envolve a proteína Hsp-70-2, ciclinas A1 e B, Cdc2 quinase e o MPF (M-phase-promoting factor ou maturation-promoting factor) (Eddy, 1999; Cobb et al., 1999; Liu et al., 2000; Mita et al., 2000; Eddy, 2002). Ao que parece, estes mecanismos são importantes na transição da fase G2-M e podem, pelo menos parcialmente, explicar as alterações observadas na duração da espermatogênese, em função de variações na temperatura. No caso específico de peixes, este aspecto reforça o grau de plasticidade dos teleósteos de se adaptarem às mais variadas condições ambientais (Billard, 1986).

Finalmente, merece ser mencionado que a temperatura não só altera o ritmo de progressão celular, como também a sobrevivência das células germinativas em fases específicas do processo espermatogênico (Billard, 1968, Vilela et al., 2003). Em mamíferos com testículo escrotal, a literatura disponível cita classicamente que temperaturas mais elevadas promovem apoptoses de células espermatogênicas, principalmente nas fases meiótica e espermiogênica. No entanto, é sugerido que a fase mais afetada parece ser espécie-específica (Setchell, 1998).

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, onde estas células irão se desenvolver e formar espermatozóides maduros com características genéticas do doador. Esta nova e promissora metodologia foi inicialmente utilizada em camundongos por Brinster e colaboradores (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994) e tem proporcionado enormes possibilidades para o estudo tanto da biologia da espermatogônia tronco quanto do processo espermatogênico em si e das interações entre células de Sertoli e as células germinativas, além de pesquisas em potencial nos campos da aquicultura e pecuária, preservação de espécies, medicina reprodutiva e produção de animais transgênicos (Dym, 1994; Hausler & Russell, 1999; França & Russell, 2000; Izadyar et al., 2000; Nagano et al., 2000; Griswold et al., 2001; McLean et al., 2001; Meachem et al., 2001; Nagano et al., 2001a; Brinster, 2002; Hamra et al., 2002; Nagano et al., 2002a; Orwig et al., 2002a; Dobrinski, 2005a e b; Khaira et al., 2005; McLean, 2005).

Outro avanço muito importante propiciado por esta técnica de transplante foi o sucesso dos transplantes interespecíficos de espermatogônias tronco de rato para camundongo e de hamster para camundongo (Clouthier et al., 1996; Ogawa et al., 1999a). Nesta situação de transplante xenogênico, os camundongos receptores eram imunodeficientes como o *nude mice* (sem linfócitos T) ou camundongos SCID (sem linfócitos T e B). Células germinativas de coelhos, cães, 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 espermatogonial não foi observada (Dobrinski et al., 1999; Dobrinski et al., 2000; Reis et al., 2000; Nagano et al., 2001b; Nagano et al., 2002b). 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). A menor eficiência do transplante entre hamsters 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., 1999a) provavelmente ilustra a influência da filogenia no sucesso do transplante. Talvez, esta limitação ocorra devido às 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 pode 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) e cultivadas (Brinster & Nagano, 1998; Nagano et al., 1998) foram também avanços bastante importantes conseguido através da técnica do transplante de espermatogônias. Pois, diferente do congelamento de sêmen onde uma quantidade finita de células é preservada, o congelamento e o armazenamento de células germinativas permite preservar indefinidamente as linhagens de células espermatogênicas 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 durante a meiose (Dobrinski, 2005). Num contexto bem amplo, as espermatogônias tronco podem ser consideradas ‘imortais’ (Avarbock et al., 1996).

Além de roedores, o transplante intra-específico de espermatogônias também tem sido realizado com sucesso em animais de grande porte como suíno, caprino, bovino ou mesmo macacos (Schlatt et al., 2002, Honaramooz et al., 2002a, Honaramooz et al., 2003a, Honaramooz et al., 2003b; Izadyar et al., 2003; Dobrinski, 2005b; Ehmcke et al., 2005). Mesmo com este enorme potencial de utilização, deve ser ressaltado que a eficiência do transplante é ainda relativamente baixa, merecendo este aspecto ser ainda melhor investigado (Griswold et al., 2001; Dobrinski, 2005a e b; Khaira et al., 2005; McLean, 2005).

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 as células germinativas do animal doador são isoladas utilizando-se protocolo de digestão enzimática dupla (tripsina e colagenase). Após lavagem em meio de cultura rotineiro, as células espermatogênicas são ressuspendidas 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* localizada na região do mediastino testicular. Para isso utiliza-se de canulação guiada por ultrasonografia. (Schlat et al., 1999; Honaramooz et al., 2002a, 2003a, b). Com a finalidade de monitorar a viabilidade das células germinativas e o percentual de túbulos seminíferos preenchidos com a suspensão celular, o corante vital azul de tripan é 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 contém somente 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), camundongos W/W constituem excelente modelo experimental para ser utilizado como receptor. Esses mutantes apresentam deficiência nos receptores tirosina kinase c-kit. Como o complexo receptor c-kit/ligante é essencial para a proliferação e diferenciação das espermatogônias (De Rooij & Russel, 2000) e está associado à migração e proliferação das células germinativas primordiais durante a embriogênese (Mintz & Russell, 1957), os camundongos W/W 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.

Animais com espermatogênese completa podem também ser empregados como receptores no transplante. No entanto, antes do transplante, estes animais devem ter sua espermatogênese endógena destruída. Com este objetivo, os mesmos são tratados com a droga quimioterápica busulfan (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 local (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., 2005). Os efeitos citotóxicos do busulfan (1,4-dimetanosulfonoxibutano) 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., 1999a; Brinster 2003). No entanto, mesmo quando o tratamento é eficaz, nem todas as espermatogônias tronco são destruídas (Bucci & Meistrich, 1987). Desta forma, a depleção induzida pelo busulfan é reversível, uma vez que, parte da espermatogênese endógena pode ainda persistir após o tratamento.

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 diminuem 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., 1999a; Vecino et al., 2001) a fim de melhorar as condições no microambiente testicular receptor. 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. 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 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 aproximadamente 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 (LacZ, da *Escherichia coli*), que persistem por várias gerações sucessivas de animais e que se coram também de azul através de técnicas específicas (X-gal) para a β -galactosidase (Brinster & Avarbock, 1994). Outros marcadores tais como o GFP (green fluorescent protein) e o Rosa26 também são utilizados para se identificar as células germinativas transplantadas (Dobrinski, 2005a).

Recentemente, foi demonstrado que o corante fluorescente PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker - Sigma), adicionado à suspensão celular, pode ser utilizado como marcador das células germinativas transplantadas (Honaramooz et al., 2002a; Honaramooz et al., 2003a). Este marcador é uma molécula alifática conjugada ao fluorocromo TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina) que se intercala na bicamada lipídica da membrana celular. Ao se ligar de forma estável a membrana celular o PKH26 permite, através de fluorescência com emissão de luz de cor vermelha, a identificação das células injetadas dentro do testículo receptor por um período relativamente longo (alguns meses; Honaramooz et al., 2002a).

Além dos marcadores já citados, as células germinativas, principalmente espermátides e espermatozóides de espécies diferentes, podem também ser prontamente distinguidas no epitélio seminífero e epidídimo do receptor através de suas características morfológicas 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).

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 espermatozóides férteis em camundongos normais, a partir do transplante de células germinativas de camundongos *knockout* para receptor de estrógeno do tipo α (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 (SI), 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). Estes estudos ilustram com bastante veemência a aplicabilidade desta fascinante metodologia.

Não existem ainda na literatura relatos a respeito do transplante de espermatogônias diretamente no testículo de peixes. No entanto, técnica para o transplante de células germinativas primordiais (PGCs) interespecífico em salmonídeos foi recentemente estabelecida (Takeuchi et al., 2003). Neste estudo, PGCs de trutas arco-íris transgênicas carregando o gene da proteína fluorescente verde (green fluorescent protein ou GFP) foram isoladas e transplantadas dentro da cavidade celomática de larvas de salmões yamame. A verificação posterior de fluorescência 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. Além disso, quando ovos de trutas foram inseminados com ejaculado de salmões transplantados, embriões apresentando fenótipo de trutas arco-íris foram produzidos com sucesso (Takeuchi et al., 2003). Em outro estudo ainda mais recente, ovócitos foram produzidos em trutas arco-íris a partir do transplante de espermatogônias tronco oriundas de trutas machos adultas, na cavidade celomática de larvas desta espécie (Okutsu et al., 2006).

1.6- Perspectivas do transplante de espermatogônias

A partir dos comentários anteriores pode ser inferido que o futuro do transplante de células germinativas 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 seja encontrado. Se um sistema adequado de cultura for desenvolvido, o transplante de células germinativas modificadas geneticamente será bastante facilitado, conforme foi demonstrado por Nagano e colaboradores (2001b). Neste estudo, estes pesquisadores foram capazes de produzir camundongos transgênicos através da transdução retroviral de células tronco germinativas. Ratos transgênicos também foram produzidos através de transdução lentiviral e retroviral (Hamra et

al., 2002; Orwig et al., 2002). Além disso, o promissor uso do vetor viral adeno-associado para produzir células germinativas transgênicas de suínos tem sido demonstrado (Honaramooz et al., 2003c). Esta rota de engenharia genética, juntamente com a recombinação homóloga das células germinativas (Guillaudoux et al., 2000; Celebi et al., 2002), 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* (IVF) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), menor número de espermatozóides é requerido para que a fertilização ocorra.

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 químico 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 mais ainda estas perspectivas e contrapondo o limite filogenético, como alternativa ao transplante de células germinativas isoladas, o transplante de fragmentos testiculares de algumas espécies de mamíferos (camundongo, suíno, caprino, macaco Rhesus) sob a pele de camundongos nude mice castrados, tem sido desenvolvido (Honaramooz et al., 2002b; Schlatt et al., 2003; Honaramooz et al., 2004; Dobrinski, 2005a e b). Nestes trabalhos foi demonstrada a produção de espermatozóides normais e viáveis. 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., 2005). Em conjunto, estes resultados indicam que os mecanismos de regulação da espermatogênese em mamíferos estão bastante conservados durante a evolução. Esta metodologia também apresenta enormes possibilidades de aplicação na biologia da reprodução de mamíferos (Dobrinski, 2005a e b), 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 recém-publicado 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 células germinativas primordiais ou de espermatogônias tronco na cavidade celomática de larvas de peixe 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 (Takeuchi et al., 2003; 2004; Okutsu et al., 2006). Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas metodológicas de transplante de células germinativas diretamente nos testículos de peixes adultos com certeza irá expandir enormemente as possibilidades acima mencionadas na área de biotecnologia e produção aplicadas à aquicultura.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Conforme já foi salientado, o transplante de células germinativas 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, onde estas células irão se desenvolver e formar espermatozóides maduros com características genéticas do doador. Esta abordagem experimental tem sido largamente utilizada na última década em mamíferos, com a finalidade de se investigar o processo espermatogênico e a biologia da espermatogônia tronco. Esta técnica também apresenta alto potencial para estudos envolvendo a biotecnologia, a produção de animais transgênicos e a preservação do material genético de animais zootecnicamente valiosos e de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, o sucesso e a eficiência do transplante de células germinativas depende de um animal receptor no qual a espermatogênese esteja naturalmente ausente ou deprimida experimentalmente. Embora esta técnica esteja bem caracterizada em mamíferos, principalmente ratos e camundongos, no nosso conhecimento, não existem estudos utilizando esta abordagem em peixes. Provavelmente, este aspecto deve-se ao fato de não existirem modelos experimentais funcionais nos quais a espermatogênese endógena nestes vertebrados esteja ausente ou deprimida experimentalmente. A tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) representa um excelente modelo experimental para o transplante de espermatogônias, pelo fato de apresentar rápido crescimento e tamanho relativamente pequeno quando atingem a maturidade sexual. Além disso, esta espécie de teleósteo possui boa capacidade de adaptação às condições experimentais de laboratório e importância econômica. Desta forma, após termos padronizado em nosso laboratório os protocolos de depleção de espermatogênese endógena em tilápias, utilizando-se a droga quimioterápica busulfan em associação com a temperatura de 35°C, nosso principal objetivo no presente estudo foi o de se investigar a viabilidade da tilápia adulta como modelo experimental receptor, para o transplante de células germinativas intra-espécies. Neste contexto, as seguintes etapas foram desenvolvidas no presente trabalho:

- A) Promoção da depleção da espermatogênese endógena dos animais receptores, associando-se o tratamento com a droga quimioterápica busulfan com a temperatura de 35°C;
- B) Padronização das técnicas de dissociação enzimática dos testículos de tilápias e separação das espermatogônias, através de gradiente de Percoll;
- C) Padronização da técnica de marcação das células espermatogênicas das tilápias doadoras utilizando-se o corante fluorescente PKH26;
- D) Padronização da via de transplante de células germinativas através do ducto espermático comum cuja abertura se localiza na papila urogenital de tilápias-nilóticas;
- E) Investigação, através de microscopia de fluorescência, da presença de células germinativas marcadas com PKH26 nos testículos de animais receptores sacrificados após o transplante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

As tilápias-nilóticas da variedade tailandesa (*Oreochromis niloticus*) utilizadas no presente trabalho foram procedentes da Estação de Aqüicultura Geneforte, Pedro Leopoldo, MG. No entanto, durante o período de padronização de algumas técnicas metodológicas foram utilizados exemplares de tilápias da mesma variedade e procedentes da Estação de Aqüicultura MultiGene, Esmeraldas, MG; Lagoa dos Tucunares do Condomínio Nossa Fazenda, Esmeraldas, MG; e do Pesque-Pague Paquinha, Itabira, MG. Todas as tilápias passaram por um período de adaptação de aproximadamente dez dias às condições do anexo do Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG, antes de serem utilizadas nos experimentos. Estes animais foram mantidos em aquários plásticos contendo 250 litros de água, à temperatura de 25°C, sob um fotoperíodo de 12-14 horas diárias e foram alimentados *ad libitum* com ração comercial para peixes (Laguna - Socil). Como procedimentos auxiliares na manutenção da qualidade da água, aeradores e filtros biológicos foram utilizados. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG; protocolo nº 071/05). Antes de iniciar qualquer etapa do presente trabalho que requeria manipulação efetiva das tilápias, as mesmas foram previamente anestesiadas utilizando-se quinaldina (Merk) dissolvida em água na proporção de 0,5ml/L, por aproximadamente 5 minutos.

3.2 - Depleção da espermatogênese endógena dos animais receptores

O protocolo utilizado foi baseado em trabalhos recentes desenvolvidos no Laboratório de Biologia Celular mostrando que duas injeções de busulfan, em associação com a temperatura de 35°C, foi uma abordagem bastante eficiente de depleção da espermatogênese endógena de tilápias adultas [(Figuras 1 a 3) (Silva et al., 2004; França et al., 2005)]. Desta

forma, no presente trabalho oito tilápias machos sexualmente maduras, mantidas à temperatura de 35°C, foram tratadas 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, 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, Merk) e, posteriormente, em água destilada sob agitação constante à 37°C.

Com a finalidade de se averiguar o status da espermatogênese endógena, duas tilápias mantidas à 35°C foram utilizadas como controle e também receberam duas injeções, contendo somente os diluentes (DMSO e água destilada), através da mesma via. Estas tilápias foram sacrificadas e tiveram os seus testículos coletados 3 semanas após a primeira injeção para análises histológicas. Duas tilápias sexualmente maduras mantidas a 25°C e que não receberam nenhum tratamento foram também sacrificadas e serviram como controle.

A temperatura ideal para que a espermatogênese em tilápias ocorra de forma normal é de 24 a 26°C. Com o objetivo de se investigar possíveis alterações nas células de Leydig em decorrência do tratamento com busulfan e da temperatura (25°C vs. 35°C), 40 tilápias sexualmente maduras de outros experimentos em andamento em nosso laboratório foram investigadas três semanas após receberem injeções de busulfan, conforme protocolo descrito anteriormente. Adicionalmente, cinco tilápias adultas tratadas com busulfan e mantidas a 35°C foram sacrificadas 35 e 70 dias após terem recebido a primeira injeção da droga, com a finalidade de se investigar um possível efeito isolado da temperatura nas células de Leydig. Após o período experimental programado, fragmentos testiculares foram preparados rotineiramente para análises histológicas e morfométricas.

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi investigado, ao microscópio ótico, empregando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Mil pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig foram contados por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma. Em outra etapa, o diâmetro nuclear médio destas células foi obtido com o auxílio de uma régua micrométrica acoplada à ocular, em aumento de 1000x. Vinte núcleos de células de Leydig foram medidos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que apresentaram o contorno mais

arredondado possível e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir dos dados acima obtidos e aplicando-se as fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear, o volume do citoplasma e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig por animal. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos.

$$\text{Volume nuclear} = 4/3\pi R^3 \quad \text{onde, R = raio nuclear}$$

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

3.3 - Processamento para análise em microscópio de luz

Os fragmentos de testículos das tilápias 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 com navalhas de vidro em micrótomo JB-4 Sorvall. Estas secções com espessuras de 4µm foram colocados em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina + borato de sódio a 1%, sendo posteriormente montados com Entellan (Merck). Para a análise morfológica e documentação fotográfica utilizou-se o fotomicroscópio BX-60 Olympus equipado com câmera fotográfica digital Q-color 3 da Olympus .

3.4 - Processamento para análise em microscopia eletrônica de varredura

Pelo fato da microscopia eletrônica de varredura (MEV) propiciar imagens bastante ilustrativas e representativas, testículos de animais controle mantidos a 35°C e de animais que receberam tratamento para depleção da espermatogênese endógena foram também preparados para serem analisados em MEV.

Desta forma, fragmentos testiculares foram imersos em solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2- 7,4 a 4°C, por aproximadamente 24 horas. Após a fixação primária, o material foi lavado em tampão fosfato e pós-fixado por 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão. Logo em seguida, os fragmentos testiculares foram imersos em solução de ácido tânico a 1%, em água destilada, por 40 minutos e na seqüência fixados novamente em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, seguido de lavagens

em água destilada. Os fragmentos foram posteriormente desidratados em soluções crescentes (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) de álcool, sendo em seguida congelados em nitrogênio e fraturados. Após secagem em aparelho de ponto crítico de CO₂ (CPD-020, Balzers), os fragmentos foram montados em suportes e metalizados com ouro. O material assim preparado foi analisado no microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM 950 (West Germany) do Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do ICB/UFMG.

3.5 - Obtenção das células germinativas para o transplante

Nesta etapa, oito tilápias machos adultas foram utilizadas como animais doadores. As células germinativas utilizadas no transplante foram obtidas através de digestão enzimática (colagenase, tripsina e DNase) dos testículos desses animais. Desta forma, protocolos anteriormente descritos (Bellvé et al,1977; Chaves- Pozo et al, 2004) foram adaptados e padronizados de acordo com os nossos objetivos, conforme segue:

Dissociação enzimática dos testículos

Após serem anestesiadas as tilápias foram pesadas e aspergidas em álcool a 70%, com a finalidade de facilitar a realização dos procedimentos necessários em condições mais assépticas e à temperatura ambiente. Assim, os testículos foram coletados cuidadosamente em capela de fluxo laminar e lavados em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) contendo 0,1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (10000U.I./10mg/ml, Cultilab). Estes testículos foram pesados, cortados em pequenos fragmentos (~2mm³) e lavados por várias vezes (até cinco vezes) em HBSS, a fim de se retirar o excesso de sêmen e sangue. A seguir, preparou-se uma solução de colagenase (Tipo IA, Sigma) em meio de cultura DEMEM (Dubelco's Modified Eagle Médium, Cultilab) 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% (Cultilab). Após 20 minutos sob leve agitação, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Cultilab). DNase I (20µg/ml; Sigma) foi novamente adicionada à suspensão celular facilitando assim o processo

de filtragem da mesma que foi realizado em peneira (Sigma) com poros de aproximadamente 100µm. O filtrado assim obtido foi centrifugado por 10 minutos à 100g. Após retirada cuidadosa do sobrenadante, as células foram ressuspensas em DEMEM suplementado com 0,75% (p/v) de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma), sendo este procedimento usualmente repetido.

Separação, seleção e avaliação das células germinativas

O maior sucesso da técnica de transplante de células germinativas requer a obtenção de populações celulares enriquecidas em espermatogônias. Pois, dentre as diversas células do processo espermatogênico que podem ser transplantadas nos túbulos seminíferos, e eventualmente formarem espermatozoides, apenas as espermatogônias tronco tem a capacidade de se auto-renovar e de formar continuamente células germinativas mais maduras (Brinster & Zimmermann, 1994; Brinster & Avarbock, 1994). 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 (Cultilab), com o objetivo de se obter maior concentração de espermatogônias na suspensão a ser transplantada.

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 (Cultilab), solução esta denominada Percoll 100%. A partir desta solução e utilizando-se DEMEM-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 contendo Percoll 10%, 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 e posteriormente selecionadas.

Com o objetivo de se avaliar histologicamente a eficiência da separação celular, de acordo com a utilização das diferentes concentrações de Percoll acima citadas, células provenientes da digestão dos testículos de duas tilápias adultas foram utilizadas. Assim, após a centrifugação, as bandas celulares formadas foram coletadas isoladamente e colocadas em tubos Eppendorf, lavadas em DEMEM-BSA, centrifugadas e ressuspensas em glutaraldeído

a 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2-7,4, a 4°C. Após 24 horas de fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão, centrifugadas e ressuspensas em meio ágar-ágar 3% (p/v) ainda líquido. Após a solidificação do meio presente no tubo Eppendorf, os pellets celulares obtidos foram retirados e cortados em pequenos cubos que foram processados rotineiramente e incluídos em glicol metacrilato. Este material foi posteriormente seccionado a 4µm e corado com azul de toluidina + borato de sódio a 1%. Para as análises histológicas e documentação fotográfica utilizou-se o fotomicroscópio BX-60 Olympus equipado com câmera fotográfica digital Q-color 3 da Olympus.

3.6 - 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 foi comentado no item de introdução e revisão de literatura, características morfológicas peculiares dos espermatozoides, o LacZ, a proteína fluorescente verde (GFP), o ROSA26 e o PKH26 são os marcadores mais utilizados para se monitorar a presença de células germinativas transplantadas. No caso específico do presente trabalho, por marcar a membrana citoplasmática por alguns meses, o corante fluorescente PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker - Sigma) foi por nós considerado o marcador mais conveniente. Desta forma, a padronização da marcação de células germinativas de tilápias com o PKH26 foi efetuada a partir de protocolos citados na literatura e de orientações do fabricante contidas no kit do produto. Assim, as células germinativas selecionadas foram lavadas novamente em DEMEM (sem soro ou BSA) por 10 minutos a 400g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente de forma que uma quantidade mínima de DEMEM permanecesse sobre o pellet. Em seguida, as células germinativas selecionadas foram contadas utilizando-se câmara de Neubauer. Para cada milhão (10^6) de células foi acrescentado 1ml do Diluente C (solução aquosa iso-osmótica livre de Ca^{2+} ou outros sais fisiológicos, Sigma) onde o pellet foi ressuspensado até a sua completa dispersão. Em seguida, preparou-se a 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, procedimento este também utilizado em todas as etapas de padronização deste protocolo.

Quatro diferentes concentrações da solução corante e quatro diferentes períodos de incubação foram testados, conforme segue: a) 32 μ l de PKH26/mL do Diluente C, durante 6 minutos; b) 10 μ l de PKH26/mL do Diluente C, durante 15 minutos; c) 6 μ l de PKH26/mL do Diluente C, durante 10 minutos; e d) 2 μ l de PKH26/mL do Diluente C, durante 40 minutos. Com a finalidade de se observar a viabilidade celular (eventual presença de células mortas), o corante vital azul de tripan a 0,4% em solução salina a 0,9% foi adicionado a suspensão celular marcada com PKH26, na proporção de 1:1. A proporção de células marcadas com PKH26, a intensidade da fluorescência deste marcador, e a viabilidade celular investigada com o azul de tripan (este corante atravessa a membrana celular apenas de células mortas), foram avaliadas através de microscopias de fluorescência e de luz convencional. Estas análises mostraram que na concentração de 32 μ l de PKH26 a viabilidade celular apresentava-se nitidamente menor (mais células mortas por campo), enquanto na concentração de 6 μ l esta viabilidade podia ser considerada ótima. Por outro lado, apesar da viabilidade celular estar excelente, na concentração de 2 μ l a intensidade de marcação celular podia ser considerada bastante fraca. Aparentemente e provavelmente devido a concentração de PKH26 ser muito baixa, o longo tempo de exposição celular utilizado (40 minutos), em associação com a concentração de 2 μ l de PKH26, não afetou a viabilidade celular, mesmo considerando que o etanol presente na solução estoque de PKH26 pode ser tóxico para as células. Levando-se em consideração as observações acima mencionadas, optou-se por utilizar como protocolo viável de marcação de células germinativas de tilápias 8 μ l de PKH26/mL de Diluente C, por 10 minutos. Protocolo este que provavelmente resultaria em elevada intensidade de marcação associada com alta viabilidade celular. É apropriado mencionar que o presente protocolo deve contemplar um longo período de tempo (várias semanas), marcando células que serão avaliadas após no mínimo cerca de dez divisões celulares. Uma vez que pretendemos encontrar células germinativas marcadas e mais avançadas no processo espermatogênico, em tese resultantes de espermatogônias tronco intensamente marcadas com PKH26. De acordo com o fabricante de PKH26 (Sigma), este marcador pode permanecer na membrana celular por 3-4 meses em hemácias de coelho, que obviamente não sofrem divisão.

Durante a utilização do protocolo escolhido (8 μ l de PKH26) para marcação de células germinativas a reação foi interrompida após 10 minutos através da adição de volume igual de Soro Fetal Bovino (BSF; Cultilab), por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se a esta suspensão volume igual de DEMEM-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.

3.7 - Via de Transplante

Devido às diferenças anatômicas do trato genital masculino, as vias de transplante utilizadas usualmente (túbulos seminíferos, rete testis e ductulos eferentes. (Ogawa et al., 1997) para mamíferos não podem ser extrapoladas para teleósteos. Isto se deve ao fato de os testículos dos peixes estarem localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestivo e ventro-lateralmente a bexiga gasosa. Apesar dos rins estarem localizados retroperitonealmente e dorsalmente à bexiga gasosa e aos testículos, seus ductos desembocam na bexiga urinária, que fica localizada mais ventralmente aos testículos, cujo ducto (uretra) desemboca na papila urogenital. Portanto, a única via não cirúrgica que permite o acesso aos túbulos seminíferos em tilápias é através do poro urogenital localizado na papila de mesmo nome.

Em tilápias macho, a papila urogenital pode ser facilmente reconhecida como uma discreta protuberância ventral, localizada caudalmente ao ânus. Esta estrutura apresenta uma abertura única, o poro urogenital, onde se desembocam o ducto urinário (uretra) e o ducto espermático (genital) comum aos dois testículos. Assim, o conhecimento anatômico detalhado da disposição destes ductos é de fundamental importância para se investigar a possibilidade de se transplantar células germinativas, através desta via, dentro dos testículos de tilápias sexualmente maduras.

Desta forma, com a finalidade de se investigar pormenorizadamente a via de transplante de células germinativas, as papilas urogenitais, juntamente com a porção distal dos testículos de quatro animais adultos foram coletadas, fixadas e processadas rotineiramente para análise em microscopia de luz. Nesta análise, cortes seriados longitudinais e transversais com 4 μ m de espessura foram obtidos e avaliados histologicamente e morfometricamente, com o objetivo principal de se caracterizar a disposição do ducto urinário e ducto espermático comum, bem como o diâmetro do lume dos mesmos. De maneira geral (maiores detalhes serão mostrados no item de resultados) pode ser citado que o ducto urinário apresentou diâmetro médio maior (~310 μ m) do que o ducto espermático (~270 μ m) e sua desembocadura na papila urogenital foi mais dorsal do que este último. Também importante foi observar que o comprimento total do ducto espermático comum (direito + esquerdo), entre a sua formação

e desembocadura externa na papila urogenital, era muito curta e de aproximadamente 2 milímetros. Ou seja, o espaço útil para se introduzir a cânula era bastante limitado.

O procedimento de padronização da injeção de solução contendo azul de tripan a 0,4% foi conduzido com auxílio de microscópio estereoscópico Olympus SZX-ILLB2-100. Após a injeção desta solução, as tilápias foram sacrificadas, tendo sua cavidade celomática posteriormente aberta para a verificação da presença ou não do corante nos testículos. O treinamento deste procedimento foi relativamente árduo e permitiu definir e padronizar a posição, angulação, pressão, velocidade e profundidade ideal que a cânula deveria ser inserida para se atingir adequadamente o ducto espermático e não a uretra.

3.8 - Transplante de células germinativas e processamento e análise dos testículos transplantados

O transplante foi realizado após terem sido padronizados os protocolos de depleção da espermatogênese endógena com busulfan, separação e marcação das células germinativas, bem como a padronização da via de transplante. Assim, na terceira semana após o tratamento com a primeira dose de busulfan, seis tilápias com a espermatogênese deprimida receberam o transplante através da papila urogenital, com o auxílio de microscópio estereoscópico Olympus SZX-ILLB2-100, utilizando-se uma microcânula de poliestireno com aproximadamente 300 μ m de diâmetro externo em sua extremidade, acoplada a seringa de 3mL. Cada animal recebeu 2mL de suspensão celular contendo as células germinativas na concentração de 10⁶ células/mL. Esta suspensão era constituída de DEMEM e do corante vital azul de Tripan 0,4% em salina (Sigma), na proporção de 1:1. Por corar os túbulos seminíferos de forma bastante evidente, neste caso específico o azul de tripan foi utilizado com a finalidade de se avaliar a eficiência do transplante de células germinativas nos testículos. Dois animais não receberam transplante de células germinativas. Os mesmos foram sacrificados e tiveram seus testículos coletados no mesmo dia do transplante, fixados em glutaraldeído tamponado a 4%, incluídos em glicol metacrilato e preparados rotineiramente para avaliação da eficiência da depleção da espermatogênese endógena com busulfan, através de microscopia de luz convencional. Após o transplante, a temperatura da água foi gradativamente diminuída por uma semana (1-2°C por dia), até atingir 25°C. As seis tilápias transplantadas foram sacrificadas 14 horas e duas e quatro semanas após o transplante. Dois animais foram utilizados para cada tempo. Merece ser ressaltado que as tilápias sacrificadas duas e quatro semanas após o transplante não serão foco do presente estudo.

Imediatamente após a coleta, fragmentos dos testículos desses animais foram embebidos em meio apropriado (Jung Tissue Freezing Médium; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha), congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados à -80°C. Estes fragmentos foram seccionados na espessura de 5µm, utilizando-se criostato à -30°C (LEICA CM 1850; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha). Os cortes obtidos foram secos em geladeira e as lâminas montadas com éster de cianoacrilato (Super Bonder®). Para a análise histológica foi utilizado o microscópio (Olympus IX-70) de fluorescência com filtro U-MWG da Olympus. A documentação fotográfica foi feita utilizando-se câmera digital Olympus IXSPT. Estas mesmas tilápias, tiveram fragmentos de seus testículos coletados e fixados em glutaraldeído tamponado a 4%, incluídos em glicol metacrilato e preparados rotineiramente para avaliação da presença eventual de células germinativas oriundas do doador. Embora não seja objetivo específico do presente trabalho, merece ser citado que quatro tilápias não transplantadas que foram tratadas com busulfan e mantidas a 25°C também foram sacrificadas duas e quatro semanas após o dia do transplante, servindo como controle do status do grau de evolução ou eventual recuperação da espermatogênese endógena.

4. RESULTADOS

4.1 - Depleção da espermatogênese endógena dos animais receptores

Conforme citado no item de material e métodos e mostrado nas Figuras de 1 a 3, o protocolo utilizado para a depleção de células germinativas em tilápias sexualmente maduras, padronizado integralmente em nosso laboratório, foi bastante eficiente. A Figura 4 mostra secções transversais dos testículos de tilápias adultas tratadas com busulfan e mantidas a 35°C, utilizadas no presente trabalho. Nesta figura, particularmente nas imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura e de luz em maior aumento, fica claramente perceptível que os túbulos seminíferos dos animais tratados estão praticamente desprovidos de células germinativas. Embora não esteja mostrado nesta figura, células germinativas, principalmente espermatogônias isoladas com características de células imaturas, podem ser encontradas na região próxima à túnica albugíneas. Pelo fato de tilápias não terem epidídimos, e as células germinativas ficarem armazenadas numa rede de ductos denominados de eferentes, não é incomum observar espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos. Estes espermatozóides provavelmente foram liberados de cistos espermatogênicos (espermiados) presentes antes do tratamento com busulfan ou foram provenientes de cistos de células germinativas que não sofreram apoptose devido à ação da droga.

Ainda na Figura 4 pode se perceber que nas tilápias controles mantidas a 35°C, que não receberam tratamento com busulfan, a espermatogênese apresentava-se aparentemente normal, comparado com os animais controles mantidos a 25°C (Fig.3). No entanto, análise quantitativa mostrou que nos peixes mantidos a 35°C aproximadamente 4% dos cistos apresentavam células germinativas em apoptose (Fig. 2- Silva et al., 2004). As quais, em sua grande maioria (~80%), localizavam-se em cistos de espermatídes. Merece ser ressaltado que nas tilápias controles mantidas na temperatura adequada de 24-26°C, que é a temperatura normal para a evolução do processo espermatogênico desta espécie de teleosteo, cerca de

2,5% dos cistos também apresentam células germinativas em apoptose (Fig. 2), predominantemente em cistos espermatogênicos mais avançados.

Embora as células de Sertoli em peixes também apresentem capacidade esteroidogênica, à semelhança dos mamíferos as células de Leydig localizadas no compartimento intertubular de teleósteos são a principal fonte de esteróides (Schulz et al., 2001; Schulz & Miura, 2002; Schulz, 2003). Dentre estes podem ser citados a testosterona e a 11-cetotestosterona que, além de exercerem outras funções importantes para o corpo animal, também regulam o processo espermatogênico. Desta forma, a possível influência do tratamento com busulfan e da temperatura nas células de Leydig também foi investigada no presente trabalho. Embora o número de tilápias tratadas com busulfan e mantidas em temperaturas de 25°C (n = 3) e de 35°C (n = 3) não tenha sido alto, comparado com o número de animais controles (25°C, n = 16; 35°C, n = 18), os resultados encontrados (Fig. 5) mostram que o volume individual das células de Leydig aparentemente não sofreu alterações ($p > 0,05$) em decorrência das condições experimentais infligidas. Tendência semelhante foi observada para as tilápias sexualmente maduras adultas tratadas com busulfan e mantidas a 35°C por 35 e 70 dias após terem recebido a primeira injeção da droga (Figura 5).

4.2 - Obtenção das células germinativas para o transplante

Os protocolos utilizados e padronizados para a obtenção de células germinativas no presente trabalho foram adaptações daqueles previamente descritos na literatura (Bellvé et al., 1977; Chaves-Pozo et al., 2004). Os resultados obtidos a partir destes protocolos sugerem que os mesmos foram bastante eficientes. Pois, conseguimos separar com relativa segurança os diferentes tipos celulares desejados, ou seja, espermatogônias (Figura 6), dentre as quais se encontram aqueles que foram alvo maior de nosso interesse, as espermatogônias com características de células mais imaturas de acordo com o descrito em trabalho recente desenvolvido em nosso laboratório (Raso-Marques et al., 2005; Schulz et al., 2005). É importante mencionar que ainda não existe nenhum tipo de marcador específico para espermatogônias tronco em peixes. No entanto, pelo fato de suas características morfológicas serem muito semelhantes a das espermatogônias do tipo A, presentes em grande número nas duas camadas superiores da coluna de percoll (Fig. 6A-B), pode-se considerar que as mesmas encontravam-se no pool destas células. Também pode ser ressaltado que, através da análise morfológica das células germinativas selecionadas e da utilização do azul de tripan, os protocolos utilizados resultaram em grande número de células germinativas viáveis. A banda

inferior e o pellet localizado abaixo da mesma foram descartados por apresentarem predominantemente espermátócitos e espermátides (banda inferior) e hemácias, espermatozóides e restos celulares (pellet) (Fig. 6C-D).

4.3 - Marcação das células germinativas dos doadores.

A utilização do corante fluorescente PKH26 propiciou eficiente marcação da membrana citoplasmática das células da linhagem espermátogênica a serem transplantadas. A Figura 7 mostra as células marcadas com as quatro diferentes concentrações da solução contendo PKH26 e quatro diferentes períodos de incubação. Conforme pode ser observado nesta figura obtida através de microscopia de fluorescência, a concentração de 2 μ l de PKH26 resultou em intensidade de marcação celular bastante fraca, além de marcar proporcionalmente poucas células (Fig. 7A-B). Nesta mesma figura pode ser observado que, apesar da concentração de 32 μ l de PKH26 ter proporcionado intensidade de marcação bastante forte (Fig. 7G-H), o número de células marcadas era proporcionalmente pequeno pelo fato desta concentração de PKH26 ter diminuído bastante a viabilidade celular, aspecto este já comentado no item de material e métodos. Intensidade de marcação ótima e boa foi observada, respectivamente, com 10 μ l e 6 μ l de PKH26 (Fig. 7C-F). No entanto, a viabilidade celular foi um pouco melhor com 6 μ l. Esta observação nos levou a optar pela utilização de 8 μ l de PKH26 como protocolo viável de marcação de células germinativas de tilápias a serem transplantadas.

Apesar de não ter sido quantificado e nem utilizado marcadores celulares específicos para tal finalidade, outros tipos celulares do testículo, tais como células de Sertoli, peritubulares mióides e de Leydig também estavam presentes no pool de células germinativas selecionadas. No entanto, aparentemente, o número destas células parecia ser muito reduzido.

4.4 - Via de Transplante

Conforme já foi aventado no item de material e métodos, o sucesso do transplante de células germinativas diretamente no testículo depende fundamentalmente de uma via efetiva de transplante. A Figura 8 mostra a disposição e o tamanho relativo do ducto uretral e ducto espermático comum. Já a Figura 9 ilustra o procedimento de injeção da solução contendo corante vital azul de tripan a 0,4% e a aparência dos testículos dos animais sacrificados após a

injeção. Conforme pode ser notado, o grau de preenchimento dos testículos com esta solução foi consideravelmente bom.

No processo de execução desta etapa alguns comentários são pertinentes. Por exemplo, apesar de ser aparentemente simples, esta etapa foi relativamente árdua e requereu cerca de cinquenta tilápias adultas, de porte relativamente grande, para ser padronizada. Pode ser inferido que um dos aspectos que contribuiu para esta dificuldade foi o fato de utilizarmos animais sexualmente maduros e não tratados com busulfan. Este estado fisiológico conferiu um grau maior de resistência à injeção da solução contendo azul de tripan devido a maior consistência do testículo. Consistência esta provavelmente causada pela presença de grande número de células germinativas nos túbulos seminíferos, além de fluido secretado pelas células de Sertoli. A disposição dos túbulos seminíferos em tilápias, que se apresentam radiados e com fundo cego em sua porção distal (próximo à albugínea) (Vilela, 2003; Schulz et al., 2005), também pode ter contribuído para a dificuldade na difusão da solução injetada.

4.5 - Transplante de células germinativas

O transplante de células germinativas foi efetivamente realizado em tilápias após terem sido padronizadas todas as etapas consideradas fundamentais para tal finalidade. Conforme pode ser visto na Figura 10, o transplante da solução contendo as células germinativas marcadas com PKH26 em azul de tripan e foi bastante eficiente. Este sucesso pode ser externamente visualizado, através da túnica albugínea, pelo aspecto dos testículos dos animais sacrificados 14 horas após o transplante. Pois, comparado com o animal controle tratado com busulfan e que não recebeu células germinativas, o testículo do animal transplantado apresentava-se completamente azul (Fig. 10A), indicando que a solução havia preenchido o lume de praticamente todos os túbulos seminíferos, inclusive daqueles localizados na porção mais cranial dos testículos, que em tese seriam mais difíceis de serem atingidos. Portanto, de forma surpreendentemente positiva o transplante efetivo de células germinativas foi mais fácil do que se esperava, a partir da experiência obtida na fase de padronização desta etapa. Este aspecto pode ser atribuído ao fato destes animais terem sido tratados com busulfan, o que provavelmente diminuiu a resistência dos túbulos seminíferos devido à ausência quase total de células germinativas e menor presença de fluido, conforme foi aventado anteriormente. Como consequência desta menor resistência, tilápias sexualmente maduras menores podem ser utilizadas, recebendo, portanto, número proporcionalmente maior de células germinativas transplantadas, uma vez que a área total disponível de túbulos

seminíferos é mais reduzida. É importante ser mencionado que a pressão utilizada na seringa, durante o procedimento do transplante, foi muito pequena e provavelmente incapaz de romper os túbulos seminíferos e propiciar extravasamento da solução transplantada para o compartimento intertubular.

A Figura 10 mostra ainda as células germinativas transplantadas presentes nos túbulos seminíferos 14 horas pós-transplante. Estas células podem ser visualizadas tanto em microscopia de luz convencional (Fig. 10B) quanto de fluorescência (Fig. 10C-F). Nesta última, as células marcadas com PKH26 podem ser observadas no lume e em contato com a parede dos túbulos seminíferos. Aparentemente, estas células não apresentavam arranjo cístico.

Apesar de não fazer parte do escopo do presente trabalho, os resultados preliminares de estudos em desenvolvimento em nosso laboratório mostram que, algumas semanas após o transplante de células germinativas, os túbulos seminíferos de tilápias transplantadas apresentam cistos espermatogênicos marcados com PKH26.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Animais

O mercado atual de venda de alevinos de tilápias lida predominantemente com machos, ou fêmeas sexualmente revertidas para machos. No entanto, pelo fato desta reversão poder eventualmente causar alterações do trato genital (Silveira et al., 1995), no presente trabalho optamos por não utilizar machos sexualmente revertidos. Desta forma, por questões de disponibilidade, nas várias etapas desenvolvidas no presente trabalho utilizamos tilápias-nilóticas procedentes de diversos criadouros, as quais pertenciam somente à variedade tailandesa. A grande maioria destes animais era direta ou indiretamente originária da Estação de Aqüicultura MultiGene, localizada no município de Esmeraldas, MG, que comercializa por excelência animais com alto padrão zootécnico.

Às vezes somente foi possível obtermos tilápias muito jovens (alevinos) ou juvenis. Assim, de acordo com os objetivos do presente trabalho, houve a necessidade destes animais serem criados no anexo do Laboratório de Biologia Celular (LBC) do ICB/UFMG, até que os mesmos atingissem a maturidade sexual. A baixa mortalidade observada para estes peixes durante os períodos de desenvolvimento sexual e experimental nos permitiu inferir que as condições e o sistema de criação de tilápias implantados no LBC atenderam de forma bastante satisfatória aos nossos objetivos, o que confirma a adequacidade deste teleósteo como excelente modelo experimental para estudos desenvolvidos em laboratório de pesquisa.

5.2 - Depleção da espermatogênese

Vários fatores são importantes para o sucesso do transplante de células germinativas. Particularmente, os testículos dos animais receptores devem conter poucas células espermatogênicas endógenas, disponibilizando, assim, nichos para as espermatogônias tronco

do doador (exógenas). Ao mesmo tempo, as células somáticas do testículo dos receptores, tais como células de Sertoli, de Leydig e peritubulares mióides, devem estar funcionalmente saudáveis para dar suporte ao desenvolvimento das células germinativas transplantadas. Também é importante que a suspensão celular a ser transplantada contenha número adequado de espermatogônias tronco e que um procedimento viável e eficiente para a introdução das células germinativas dos doadores, nos túbulos seminíferos dos receptores, seja utilizado (Brinster et al., 2003; Dobrinski, 2005a e b; Khaira et al., 2005; McLean, 2005).

Conforme foi mencionado, a ausência de espermatogênese endógena é um dos aspectos cruciais para a eficiência do transplante de células germinativas. Em roedores, linhagens mutantes que apresentam espermatogênese deficiente ou mesmo ausente, a exemplo do que ocorre em camundongos W/W que não possuem o receptor c-Kit nas espermatogônias do tipo A, são freqüentemente utilizados como receptores do transplante de células germinativas (Brinster & Avarbock, 1994; Parreira et al., 1998; Dobrinski, 2005a). No entanto, modelos com a espermatogênese naturalmente ausente e com o ambiente testicular propício ao desenvolvimento de células germinativas não são facilmente encontrados. Assim, uma alternativa viável para substituir estes modelos é a depleção experimental da espermatogênese endógena. Com esta finalidade, várias abordagens têm sido utilizadas, podendo ser citadas principalmente o tratamento com busulfan, a radiação com raios-X e gama, ou mesmo a utilização de antagonistas de GnRH (Ogawa et al., 1998, Dobrinski et al. 2001; Vecino et al., 2001; Creemers et al, 2002, Schlatt et al, 2002; Brinster et al., 2003; Izadyar et al, 2003; Shetty et al, 2004; Honaramooz et al, 2005; Kim et al, 2005; Oatley et al, 2005; Dobrinski, 2005a e b; Khaira et al., 2005; McLean, 2005). Todas estas condições causam apoptoses das células germinativas, particularmente naquelas que se encontram em processo de síntese de DNA ou divisão celular (Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999; Choi et al., 2004), podendo ser utilizadas tanto em animais sexualmente maduros quanto nos animais mais jovens (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Ogawa et al, 1999b; Shinohara, 2001; Brinster et al, 2003; Moisan et al, 2003; Dobrinski, 2005a ; Honaramooz et al, 2005), ou mesmo quando os mesmos ainda se encontram no útero e as mães são tratadas com busulfan (Ogawa et al., 1999b; Brinster et al, 2003).

Diferentemente do que é observado para mamíferos roedores, modelos mutantes de peixes com depleção da espermatogênese endógena não foram ainda desenvolvidos e/ou testados. Desta forma, para que o transplante de células germinativas nos testículos de tilápias fosse efetuado no presente trabalho houve a necessidade do desenvolvimento de um modelo experimental funcionalmente adequado. Com este objetivo, a opção considerada tecnicamente

mais viável foi a de se investigar os efeitos do tratamento com busulfan na depleção da espermatogênese deste teleósteo. Esta abordagem foi utilizada em associação com a temperatura, a partir de resultados obtidos no LBC do ICB/UFMG (Vilela et al., 2003; Silva et al., 2004; França et al., 2005), demonstrando que a duração dos eventos espermatogênicos em tilápias-nilóticas é acelerada em temperaturas mais elevadas. Esta combinação partiu do pressuposto de que a aceleração da proliferação das células germinativas em tilápias mantidas à 30°C e 35°C faria com que as mesmas ficassem mais vulneráveis a ação da droga quimioterápica busulfan e, como consequência, sofreriam mais apoptoses. Além disso, por causar apoptoses de células germinativas, à semelhança de mamíferos (Setchell, 1998; McLean et al., 2002), as condições adversas causadas pelo estresse térmico da hipertermia em tilápias também promoveria maior depleção da espermatogênese endógena (Vilela, 2003). É importante ser salientado que o busulfan causa severa supressão hematopoiética, limitando o seu uso em determinadas espécies, uma vez que a dose efetiva para a preparação do receptor pode ser muito próxima da dose letal (Ogawa et al, 1999b, Brinster et al., 2003; Costa & França, 2005). No entanto, as dosagens utilizadas no presente trabalho, aparentemente, não resultaram em efeito sistêmicos graves nas tilápias-nilóticas sexualmente maduras tratadas, uma vez que a mortalidade nestes animais devido ao tratamento com a droga foi rara. Outro aspecto importante de ser mencionado é que além de ser efetiva na depleção da espermatogênese endógena, a associação do tratamento com busulfan e temperatura de 35°C aparentemente não comprometeu a função esteroidogênica testicular das tilápias tratadas. Pois, à semelhança do observado em ratos (Krause, 1975; Aich & Manna, 2001), a morfologia e o volume das células de Leydig não apresentaram alterações em comparação com os peixes controles. Em síntese, os resultados encontrados no presente trabalho nos permitem inferir que as abordagens por nós utilizadas foram bastante eficientes na preparação e obtenção de um modelo experimental receptor viável para o transplante de espermatogônias em peixes.

Apesar do tratamento com busulfan ter sido bastante eficiente no presente trabalho, a literatura mostra que com o passar do tempo a espermatogênese endógena pode se recuperar nos animais tratados, pelo fato de nem todas as espermatogônias tronco serem destruídas devido ao tratamento com esta droga (Brinster & Zimmermann, 1994; França et al., 1998). Assim, nestas condições, os animais que recebem o transplante podem apresentar espermatogênese endógena e exógena completas (Brinster & Zimmermann, 1994; França et al., 1998). De fato, estudos em andamento no nosso laboratório mostram recuperação gradual da espermatogênese endógena em tilápias tratadas com busulfan e investigadas várias semanas após o tratamento.

A radiação com raios-X ou gama também são relativamente bem utilizadas para se deprimir a espermatogênese endógena em mamíferos (Creemers et al, 2002; Schlatt et al, 2002; Khaira et al., 2005), apresentando-se como uma potencial abordagem para se destruir as células germinativas em tilápias. No entanto, como os testículos em peixes estão localizados dentro da cavidade celomática, esta metodologia torna-se tecnicamente pouco viável pelo fato de potencialmente poder causar lesões sistêmicas ou teciduais graves.

Uma alternativa interessante que pode ser empregada como modelo experimental receptor para o transplante de células germinativas em peixes, em substituição ao tratamento com busulfan e temperatura, é a utilização de tilápias triplóides. No entanto, apesar de existirem informações na literatura a respeito da obtenção deste tipo de modelo (Razak et al, 1999; Maclean et al., 2002), a produção destes animais ainda não está bem estabelecida. Como dificuldade adicional, não existem ainda informações consistentes a respeito da função testicular e do processo espermatogênico em tilápias triplóides. Independente destes aspectos, a investigação do potencial de peixes triplóides, particularmente tilápias, como receptor para o transplante de células germinativas é bastante tentadora.

Abordagens envolvendo tratamentos ou supressão hormonais, tais como a utilização de antagonistas de GnRH e esteróides, já são relativamente bem exploradas em mamíferos, com a obtenção de bons resultados na depleção de células germinativas endógena e criação de modelo receptor viável para o desenvolvimento das células transplantadas (Ogawa et al., 1998, Dobrinski et al. 2001; Vecino et al., 2001; Shetty et al, 2004). Portanto, estas possibilidades merecem ser exploradas em peixes. Da mesma forma, conforme já é sabido para mamíferos roedores (Shinohara et al., 2001), a possibilidade de peixes mais imaturos representarem receptores potencialmente mais adequados para o transplante deve ser investigada.

5.3 - Obtenção das células germinativas para o transplante

O número de espermatogônias tronco presentes no testículo de ratos e camundongos adultos é muito pequeno (Meistrish & Van Beek, 1993; Tegelenbosch & De Rooij, 1993; Nagano et al, 2003; Orwig et al, 2002 a, b). Particularmente em camundongos estima-se que existem ~35000 espermatogônias tronco, o que representa 3% das espermatogônias do tipo A ou 0,03% de todas as células germinativas presentes no testículo desta espécie (Tegelenbosch & De Rooij, 1993). Esta proporção de células tronco no testículo não deve ser muito diferente

em outras espécies de mamíferos, no entanto, não existem informações na literatura a este respeito para peixes.

Nos trabalhos iniciais envolvendo o transplante de espermatogônias, além de células germinativas, a suspensão celular injetada nos túbulos seminíferos e obtida somente através de digestão enzimática, continha quantidade razoável de células somáticas testiculares tais como células de Sertoli, de Leydig e peritubulares mióides (Brinster & Avarbock, 1994; Russell & Brinster, 1996). No entanto, este aspecto não impediu que esta nova e importante técnica tivesse êxito. Portanto, apesar da contaminação celular, nestes trabalhos o número de espermatogônias tronco presente na suspensão celular foi suficiente para a colonização de nichos disponíveis nos túbulos seminíferos. Além disso, antes de se comprometerem com a formação de espermatogônias diferenciadas e espermatozóides, após o transplante as células tronco que colonizam os túbulos seminíferos de camundongos se autorenovam e passam por processo de expansão por cerca de duas semanas (Parreira et al., 1998. Ohta et al., 2000).

No presente trabalho, células germinativas de tilápias adultas foram transplantadas após as mesmas terem sido fracionadas em gradiente de percoll, com a finalidade de se obter uma população celular rica em espermatogônias. Com este procedimento simples e fácil e que não requer marcações especiais e equipamentos caros e sofisticados, como ocorre por exemplo com a citometria de fluxo, maior quantidade de espermatogônias tronco está presente na população de células espermatogoniais selecionadas (Khaira et al, 2005), resultando em grande eficiência do transplante em camundongos (Koh et al., 2004).

Em mamíferos, outras abordagens têm sido empregadas com o objetivo de se enriquecer o número de espermatogônias tronco presentes na suspensão de células germinativas a serem transplantadas. Dentre estas abordagens podem ser citadas a utilização de testículos de animais imaturos, criptorquídicos, mutantes que possuem grande fração de espermatogônias indiferenciadas (camundongo SI) e animais deficientes em vitamina A nos quais a espermatogênese raramente progride além da fase espermatogonial (Shinohara et al., 2000; McLean et al., 2002; Khaira et al., 2005; Dobrinski, 2005a e b). Além disso, com o auxílio da técnica de FACS (Fluorescent-activated cell sorting) a utilização de marcadores moleculares de superfície (ex: integrinas β_1 , α_6 e α_v , $CD9^+$, $CD24^+$, $Thy-1^+$, $MHC-I$ e $Ep-CAM^+$) aumenta drasticamente o número de espermatogônias tronco presentes suspensões celulares e o número de colônias nos túbulos seminíferos (Shinohara et al., 1999; Kubota et al, 2003, Kanatsu-Shinohara et al, 2004, Ryu et al, 2004; Dobrinski, 2005a; Khaira et al., 2005; McLean, 2005). Os genes de algumas destas moléculas estão altamente conservados durante a evolução, sendo observados em invertebrados tais como drosófila e *Caenorhabditis*

elegans e mamíferos (Wong et al, 2005). No entanto, à semelhança do que ocorre para outros metazoários, não existem ainda marcadores específicos para espermatogônias tronco em peixes (Takeuchi et al., 2003).

5.4 - Marcação das células germinativas dos doadores e via de transplante

A investigação do sucesso do transplante depende fundamentalmente de marcadores das células germinativas dos animais doadores, de modo que após o transplante estas células sejam inequivocamente identificadas nos túbulos seminíferos do receptor (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Dobrinski, 2005a). Características morfológicas peculiares das células germinativas mais avançadas, tais como a forma da cabeça das espermátides/espermatozoides e o comprimento do flagelo podem ser empregados para se reconhecer as células germinativas dos doadores, nos túbulos seminíferos e epidídimos dos receptores (Cloutier et al., 1996; Ogawa et al., 1999a). Modelos de camundongos transgênicos que expressam o gene lacZ (ZflacZ, ROSA26, MtlacZ,) ou o gene GFP (green fluorescent protein) também têm sido empregados como doadores, uma vez que suas células germinativas também expressam estes marcadores (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Ohta et al, 2000; Dobrinski, 2005a). Ainda com a finalidade de se reconhecer células dos doadores nos testículos receptores, anticorpos específicos e, principalmente, o corante fluorescente PKH26 também são empregados como marcadores celulares em estudos envolvendo o transplante de células germinativas nos mamíferos. (Dobrinski et al., 1999, Schlatt et al, 1999, Honaramooz et al 2002, 2003).

O PKH-26 é um corante lipofílico desenvolvido por Horan e Slezak (1989), sendo constituído por molécula alifática conjugada ao fluorocromo TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina) que se intercala na bicamada lipídica das membranas celulares. Este corante é o mais estável membro de uma família de marcadores de superfície celular e tem sido utilizado para múltiplos propósitos em rastreamento celulares *in vivo*. Além disso, o mesmo não está associado a grandes efeitos tóxicos (Horan et al., 1990; Samlowski et al. 1991). No manual do usuário, o fornecedor garante que *in vivo* a vida média de precipitação do PKH26 em hemácias de coelho é maior do que 100 dias (Sigma-Aldrich). Em ratos, células transplantadas no cérebro do receptor e marcadas com PKH26 foram detectadas até 4 meses após o transplante (Hass et al, 2000). Em cultivo de células germinativas de porco coradas com o PKH26, grande parte destas células retêm a marcação fluorescente por 3-4 meses (Honaramooz et al., 2002a). Assim, devido as suas várias características favoráveis e

pelo fato de não existirem marcadores celulares específicos disponíveis, no presente trabalho o PKH26 foi escolhido como marcador das células germinativas a serem transplantadas em tilápias. Os resultados por nós encontrados no presente trabalho, na fase de padronização de marcação das células germinativas de tilápias, sugeriram que além de ser simples e rápida, a marcação celular com o PKH26 foi bastante eficiente e adequada, nos proporcionando grande otimismo quanto a segura identificação das células germinativas transplantadas nos testículos de tilápias receptoras.

Em mamíferos roedores de pequeno porte (ratos, camundongos e hamsteres), as células germinativas podem ser transplantadas de maneira eficiente através de microinjeção direta nos túbulos seminíferos, ductulos eferentes e *rete testis* (Ogawa et al., 1997). Enquanto nos mamíferos de maior porte a via de eleição é a *rete testis* localizada no mediastino testicular, a qual é visualizada com auxílio de ultra-sonografia (Schlatt et al., 1999; Honaramooz et al., 2002a, 2003a, b). Tecnicamente, devido às particularidades anatômicas do sistema genital masculino dos peixes, estas abordagens seriam difíceis em tilápias, pois demandariam procedimentos cirúrgicos invasivos. Além disso, o tempo de duração deste procedimento seria evidentemente mais longo, o que aumentaria o risco de mortalidade dos animais transplantados.

No presente estudo, conseguimos estabelecer um método bastante eficiente para se transplantar células germinativas diretamente nos testículos de tilápias-nilóticas. Desta forma, a única via não cirúrgica que permite o acesso aos túbulos seminíferos, o ducto espermático comum que se abre na papila urogenital, foi utilizada. Além de ser eficiente, nenhum problema foi observado durante o procedimento de transplante da solução contendo as células germinativas nos testículos das tilápias. Todos os animais apresentaram rápida recuperação da anestesia e o procedimento de transplante não requereu mais que 5 minutos. Ainda, a ausência de espermatogênese endógena nos peixes que receberam o transplante foi vantajosa, pois ofereceu baixa resistência à injeção da suspensão celular e pouco refluxo da solução injetada foi observado. Após a injeção, a coloração azulada dos testículos, visualizada através da túnica albugínea, permitiu concluir que o lume dos túbulos seminíferos destes animais foram todos praticamente preenchidos com a solução contendo células germinativas marcadas com PKH26 e o azul de tripan, apesar da pequena pressão aplicada sobre o êmbolo da seringa durante processo de injeção. Portanto, de maneira bastante positiva, a via de transplante testicular de células germinativas foi padronizada para tilápias. No entanto, vale salientar que esta via não seria aplicável a todos os peixes teleósteos, uma vez que para algumas espécies, por exemplo, o bagre africano, existe uma estrutura com aparência glandular localizada

caudalmente ao testículo, que provavelmente limitaria o acesso ao testículo através do ducto espermático comum. Neste caso, como alternativa poderia ser utilizado o transplante de células germinativas na cavidade celomática de larvas de peixes, durante a fase em que as gônadas ainda encontram-se indiferenciadas. Nesta interessante abordagem desenvolvida recentemente por Takeuchi et al. (2003), após serem transplantadas as células germinativas primordiais ou mesmo espermatogônias tronco carreando o gene da proteína fluorescente verde (green fluorescent protein ou GFP) colonizam as gônadas, podendo dar origem a ovócitos ou espermatozóides viáveis, caso a gônada se diferencie em ovário ou testículo (Takeuchi et al., 2003; 2004; Yoshizaki et al., 2005; Okutsu et al., 2006).

5.5 - Transplante de células germinativas em tilápias

O principal objetivo do presente estudo foi o de se estudar a viabilidade do transplante intra-específico (singênico) de células germinativas em tilápias-nilóticas. Com esta finalidade, várias etapas e procedimentos considerados cruciais para o transplante tais como depleção da espermatogênese endógena, obtenção, seleção e marcação das espermatogônias, além da investigação da via de transplante, foram desenvolvidos e padronizados com sucesso para tilápias. Finalmente, a presença de células germinativas marcadas com PKH26 nos túbulos seminíferos dos testículos de tilápias, avaliadas pouco tempo após o transplante, confirmou o sucesso dos procedimentos utilizados até esta etapa de nosso trabalho experimental. Pois, não era nosso objetivo avaliar se as células germinativas transplantadas seriam capazes de gerar espermatogênese completa nos animais receptores. No entanto os dados preliminares de estudos em desenvolvimento mostram que cistos espermatogênicos marcados com PKH26 estão presentes nos túbulos seminíferos de tilápias transplantadas. Estes resultados bastante promissores sugerem fortemente a viabilidade do transplante de espermatogônias em tilápias e, mais importante, mostra que a tilápia emerge como potencial modelo experimental para se investigar o processo espermatogênico, a biologia da espermatogônia tronco e a função testicular em teleósteos.

No nosso conhecimento, este é o primeiro relato bem sucedido de transplante de células germinativas diretamente nos testículos de teleósteos, e mesmo de vertebrados não mamíferos. A partir dos resultados alvissareiros obtidos no presente estudo pretendemos agora investigar a presença de cistos espermatogênicos marcados com PKH26, no período de uma a oito semanas após o transplante, bem como verificar se estes cistos se localizam preferencialmente em diferentes regiões do testículo, como por exemplo na região próxima

dos ductos eferentes onde, em contraposição com a região de fundo cego (distal) dos túbulos seminíferos, teoricamente as células germinativas transplantadas teriam mais fácil acesso e mais nichos disponíveis. Também pretendemos investigar a possibilidade de se otimizar os protocolos de seleção de espermatogônias e averiguar, principalmente através imunohistoquímica, se as espermatogônias tronco ou mesmo células germinativas mais imaturas ou primordiais podem ser identificadas em tilápias. A possibilidade de se utilizar tilápias GFP como animais doadores é relativamente grande, pois a partir de contatos recentes com pesquisadores japoneses do grupo do Dr. Goro Yoshizaki estes peixes seriam disponibilizados. Outras abordagens experimentais bastante tentadoras seriam a investigação da viabilidade do transplante de espermatogônias, após estas células terem sido congeladas e/ou cultivadas, e a viabilidade das tilápias-nilóticas como modelo receptor para o transplante de células germinativas de outras espécies de teleósteos de importância econômica ou mesmo em perigo de extinção. Em conjunto, estas instigantes abordagens propiciarão um cenário totalmente novo e bastante promissor na área de biotecnologia, conservação e produção em aquicultura.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O transplante de células germinativas intra ou interespecífico tem se mostrado uma das mais fascinantes técnicas surgidas recentemente para se investigar a espermatogênese e a biologia da célula tronco, além de potencialmente apresentar importantes aplicações na produção de animais transgênicos, nas tecnologias de reprodução assistida, em pesquisas no campo da aquicultura e pecuária e preservação de espécies em perigo de extinção. Neste estudo, a padronização da técnica do transplante de espermatogônias foi realizada em tilápias-nilóticas (*Oreochromis niloticus*) machos sexualmente maduras. Estes machos tiveram inicialmente sua espermatogênese endógena suprimida com tratamento com busulfan (18 e 15mg/kg de peso corporal) 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 tiveram em seguida suas membranas citoplasmáticas marcadas com o corante fluorescente PKH26. Estas células foram injetadas em machos adultos de tilápia, através do ducto espermático comum localizado na papila urogenital, utilizando-se técnica especificamente desenvolvida para tal finalidade. Animais analisados 15 minutos e 14 horas pós-transplante apresentavam células transplantadas marcadas com PKH26 tanto no ducto espermático como no lume dos túbulos seminíferos, sugerindo que cistos espermatogênicos marcados provavelmente seriam observados nos túbulos seminíferos, algumas semanas após o transplante. Estes resultados inéditos obtidos até o presente momento, com a utilização de protocolos inteiramente padronizados no Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG, mostraram que células germinativas podem ser transplantadas com sucesso em peixes. Desta forma, em futuro próximo, pretendemos utilizar a tilápia-nilótica como modelo experimental para se investigar a biologia das células germinativas, particularmente espermatogônias tronco, e a função testicular em peixes.

7. FIGURAS

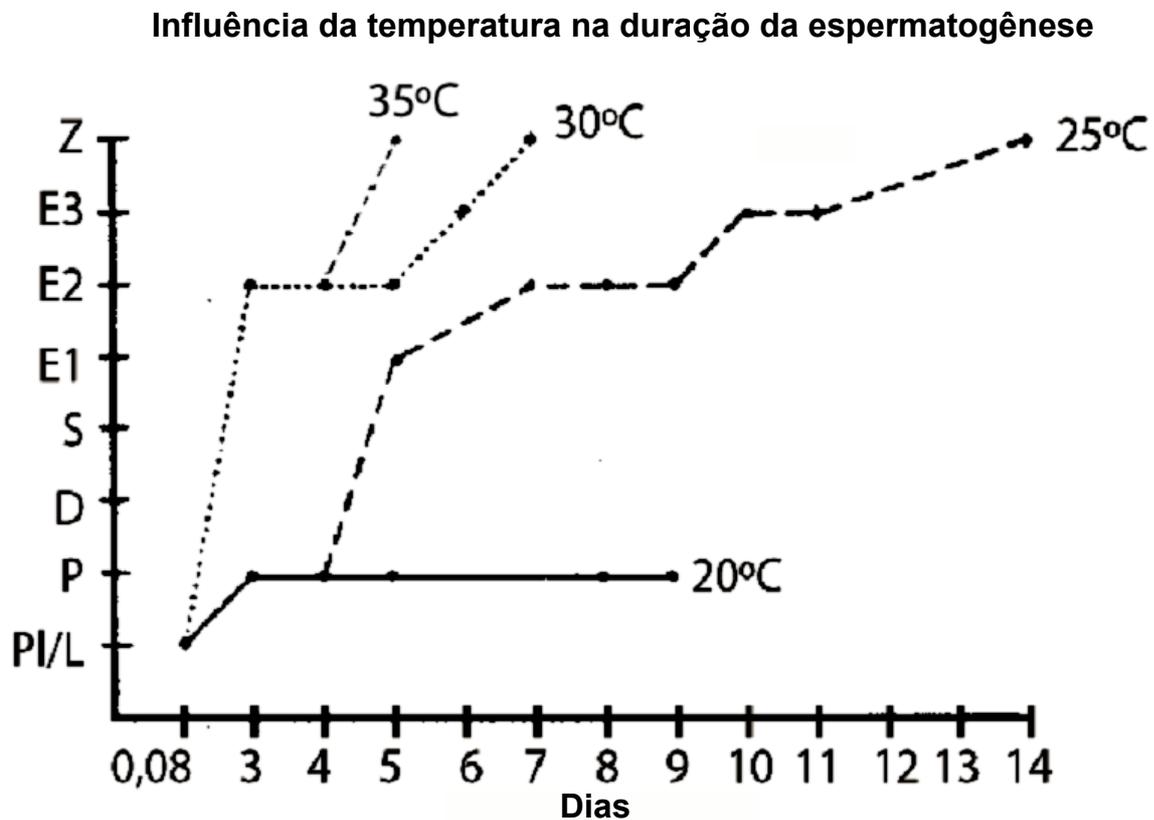


Figura 1 - Células germinativas marcadas e mais avançadas em tilápias-nilóticas sacrificadas em diferentes tempos (dias) após a injeção de timidina triciada e mantidas sob diferentes temperaturas. Observe que, comparado com 25°C, a formação de espermatozoides é bem mais rápida nas temperaturas de 30°C e de 35°C. Abreviaturas para os diferentes tipos de células germinativas: espermatoócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (PI/L); paquíteno (P); diplóteno (D); espermatoócito secundário (S); espermátides nas fases inicial (E1); intermediária (E2) e final (E3); espermatozóide (Z).
Fonte: Silva et al, 2004

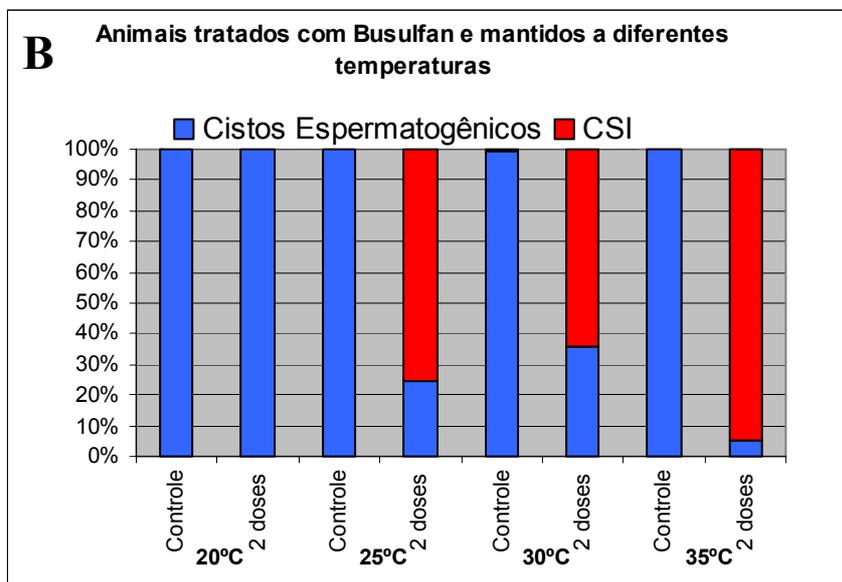
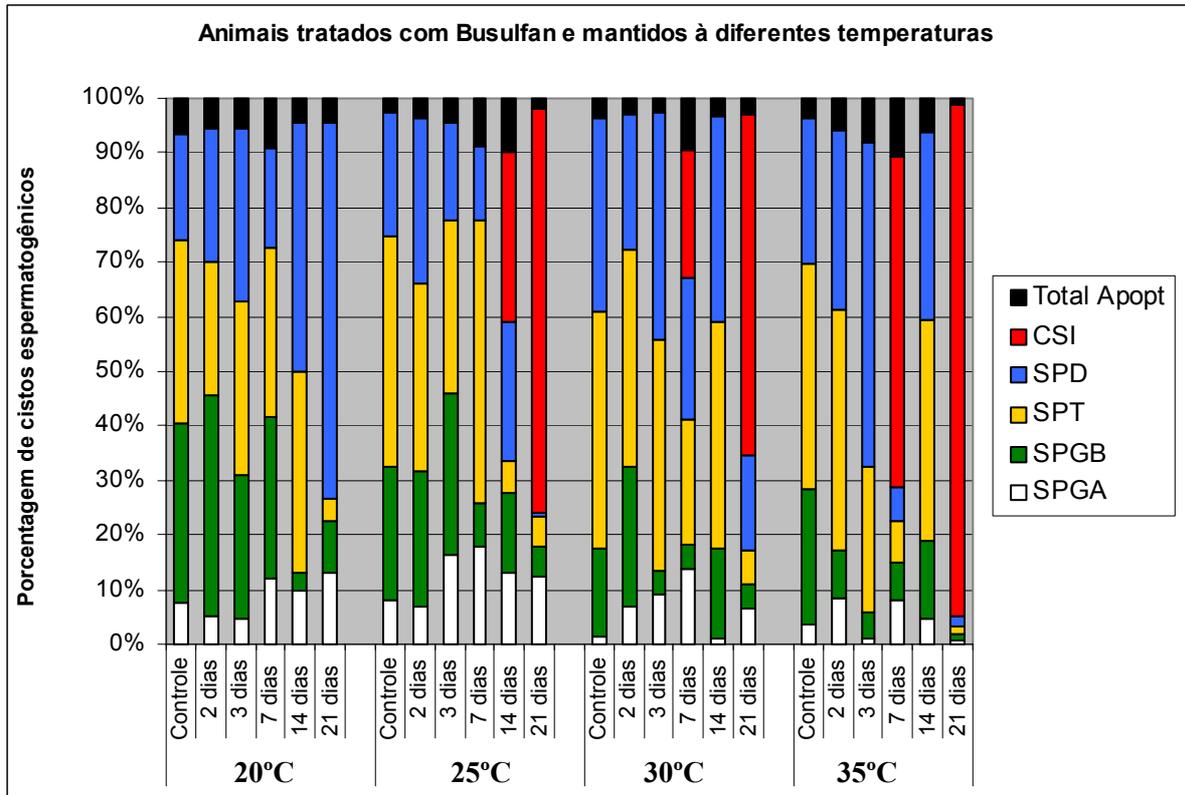


Figura 2 - Análise histológica e quantitativa dos cistos espermatogênicos presentes nos túbulos seminíferos de tilápias sexualmente maduras. Observe que, devido ao grande número de túbulos/cistos contendo somente células de Sertoli (Fig. 2A), duas injeções de busulfan, em tilápias mantidas à 35°C é a abordagem mais apropriada para se deprimir a espermatogênese endógena. A Figura 2B resume o grau de depleção da espermatogênese nas tilápias sacrificadas aos 21 dias. Abreviaturas: Total Apopt = total de cistos com apoptoses de células germinativas; CSI = cistos/túbulos seminíferos contendo somente células de Sertoli; SPD, SPT, SPGB, SPGA, cistos espermatogênicos de espermátides, espermátocitos, espermátogônias B e A, respectivamente.

Fonte: Silva et al, 2004

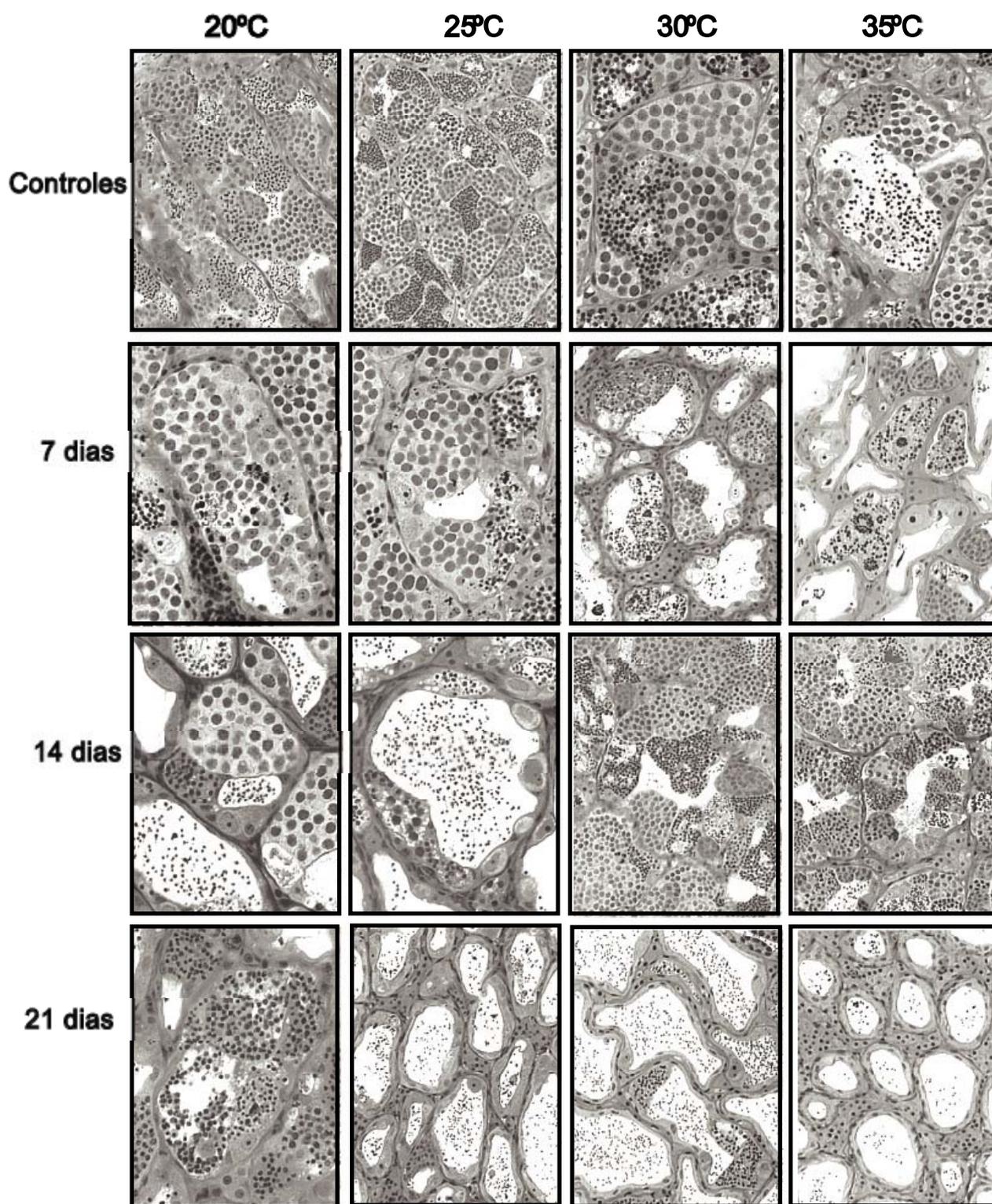


Figura 3 - Secções longitudinais e transversais de testículos de tilápias tratadas com busulfan e mantidas à 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. Os animais foram sacrificados 7, 14 e 21 dias após a injeções de busulfan. Estes ultimos foram tratados no 14º dia com uma segunda dose da droga. Sete dias após a injeção de busulfan, a espermatogênese endógena apresentava-se relativamente bem deprimida nos peixes mantidos a 35°C. No entanto, provavelmente devido à aceleração do processo espermatogênico (ver Fig. 1), as espermatogônias remanescentes aos sete dias após a injeção de busulfan foram capazes de promover a recuperação da espermatogênese endógena nas tilápias mantidas nas temperaturas de 30°C e, principalmente, de 35°C. Por outro lado, com 21 dias após a injeção da primeira dose de busulfan a espermatogênese endógena estava bastante deprimida nas tilápias mantidas à 35°C. Observe que, provavelmente pelo fato da evolução do processo espermatogênico ser muito lenta na temperatura de 20°C (ver Fig. 1), o tratamento não foi eficiente nesta condição.

Fonte: Silva et al, 2004

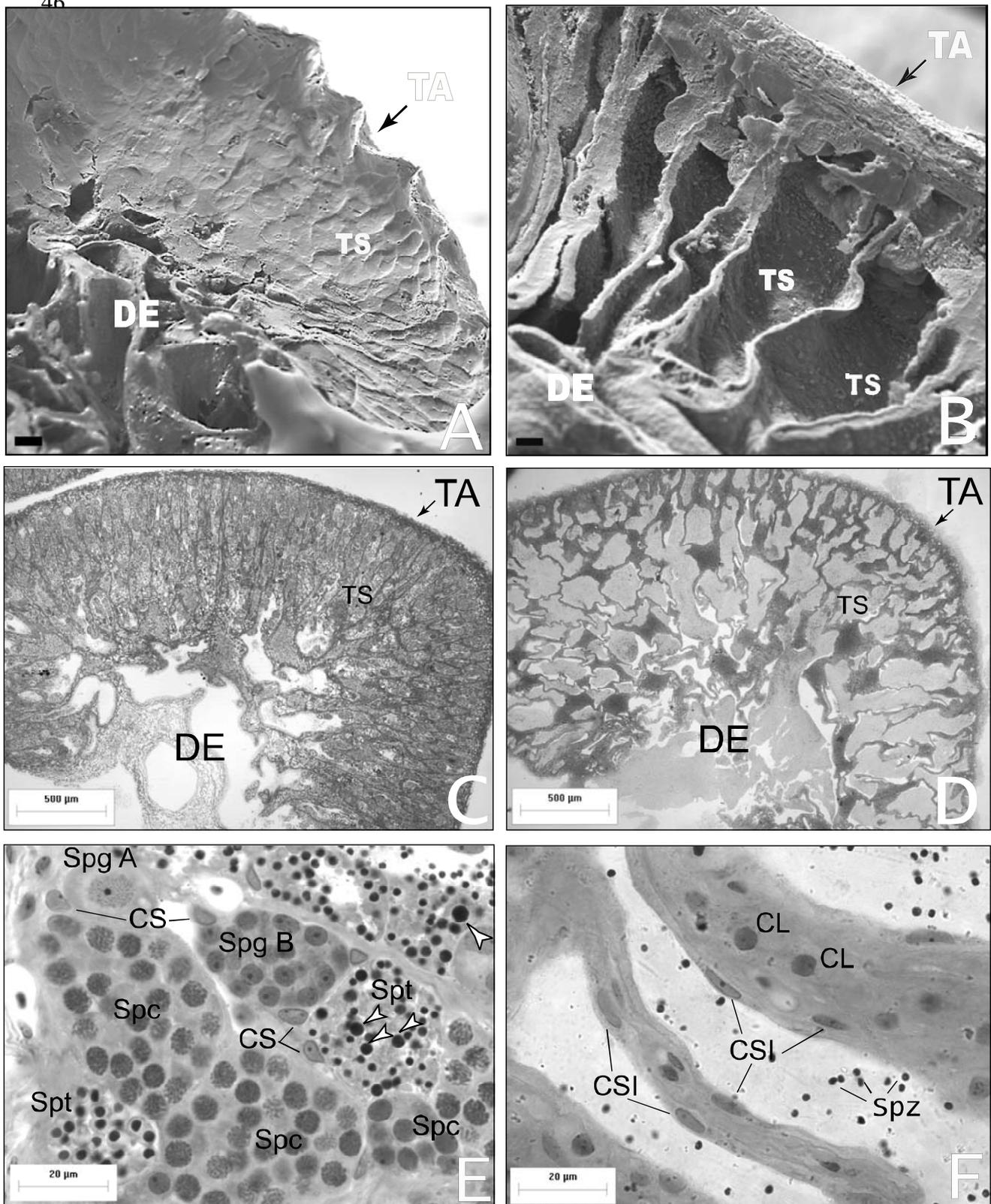


Figura 4 - Cortes transversais do testículo de tilápias sexualmente maduras e mantidas a 35°C, visualizados sob microscopias eletrônica de varredura (A-B) e de luz (C-F). Comparado com os peixes controles (A, C e E), nas tilápias tratadas com busulfan (B, D e F) a espermatogênese endógena está bastante deprimida. Observe, nos túbulos seminíferos do peixe controle (E), a presença de cistos espermatogênicos em diferentes estágios de desenvolvimento e células em apoptose que são frequentemente encontradas nos cistos de espermatídes mais avançados (setas). Na grande maioria dos túbulos seminíferos de tilápias tratadas (F), apenas células de Sertoli isoladas (CSI) estão presentes. No entanto, espermatozóides (Spz) podem ser observados no lume destes túbulos. TA = túnica albugínea; DE = região dos ductos eferentes; TS = túbulos seminíferos; Spg A = espermatogônia do tipo A; Spg B = espermatogônias do tipo B; Spc = espermatócitos; Spt = espermatídes; CS = células de Sertoli; CL = célula de Leydig. Barra = 5,0µm e 2,5µm nas Figuras A e B, respectivamente.

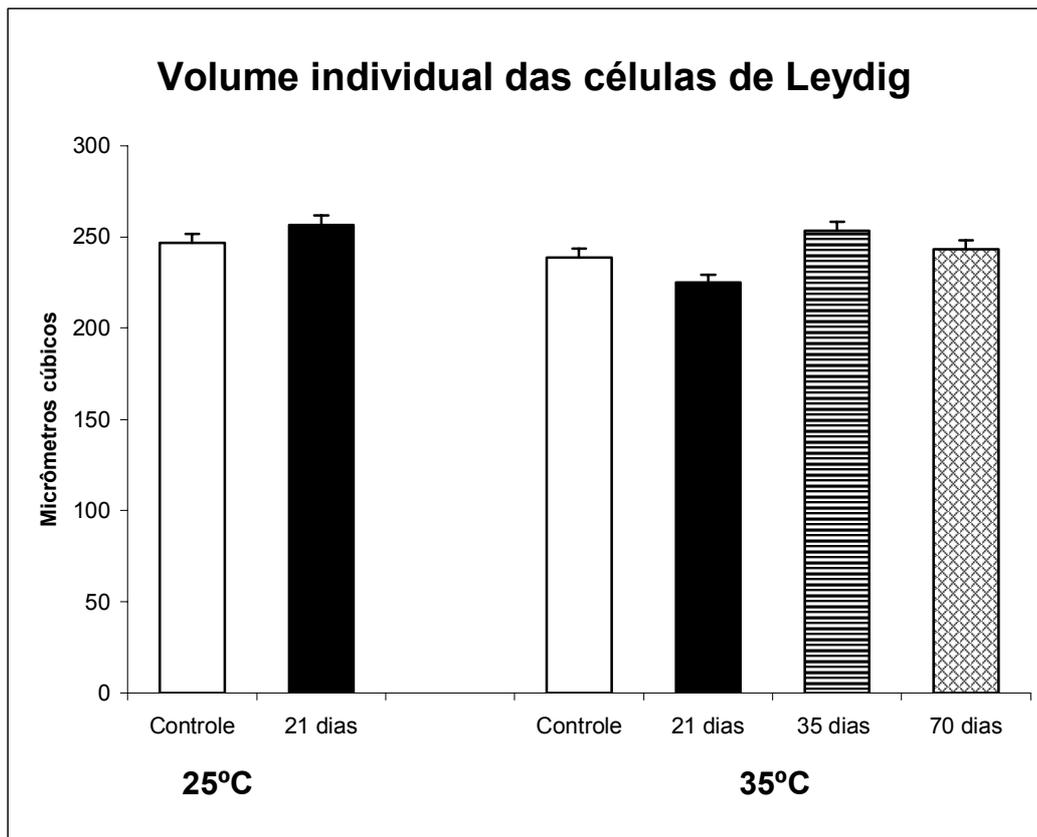


Figura 5 - Influência do tratamento com busulfan e da temperatura nas células de Leydig, em tilápias sexualmente maduras mantidas nas temperaturas de 25°C e de 35°C. Observe que, comparados entre si na mesma temperatura ou nas duas temperaturas investigadas, o volume individual das células de Leydig não apresentou alterações significativas ($p > 0,05$) em decorrência das condições experimentais impostas. Mesmo quando as tilápias tratadas com busulfan e mantidas a 35°C são avaliadas 35 e 70 dias após terem recebido a primeira injeção da droga.

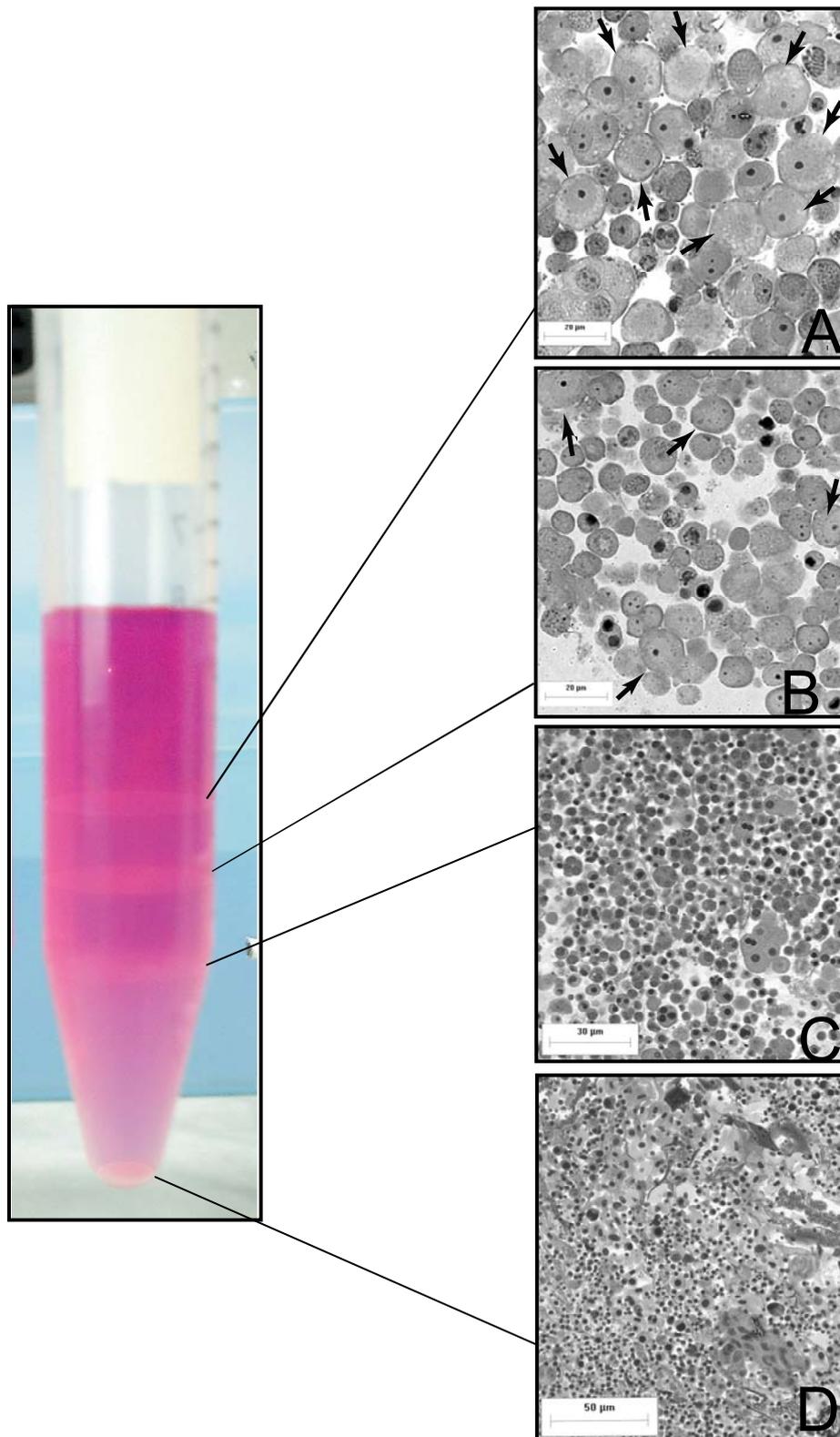


Figura 6 - Separação de células germinativas em gradiente de Percoll. Observa-se no tubo a presença de três bandas celulares distintas. As células foram fixadas, ressuspensas em ágar-ágar e incluídas em glicol metacrilato. As duas bandas superiores (A e B) foram selecionadas para o transplante por apresentarem grande concentração de espermatogônias (setas). A banda celular inferior (C) contendo, predominantemente, espermátides e espermatócitos, bem como o pellet celular (D) onde se concentram hemáceas e espermatozóides, foram descartados.

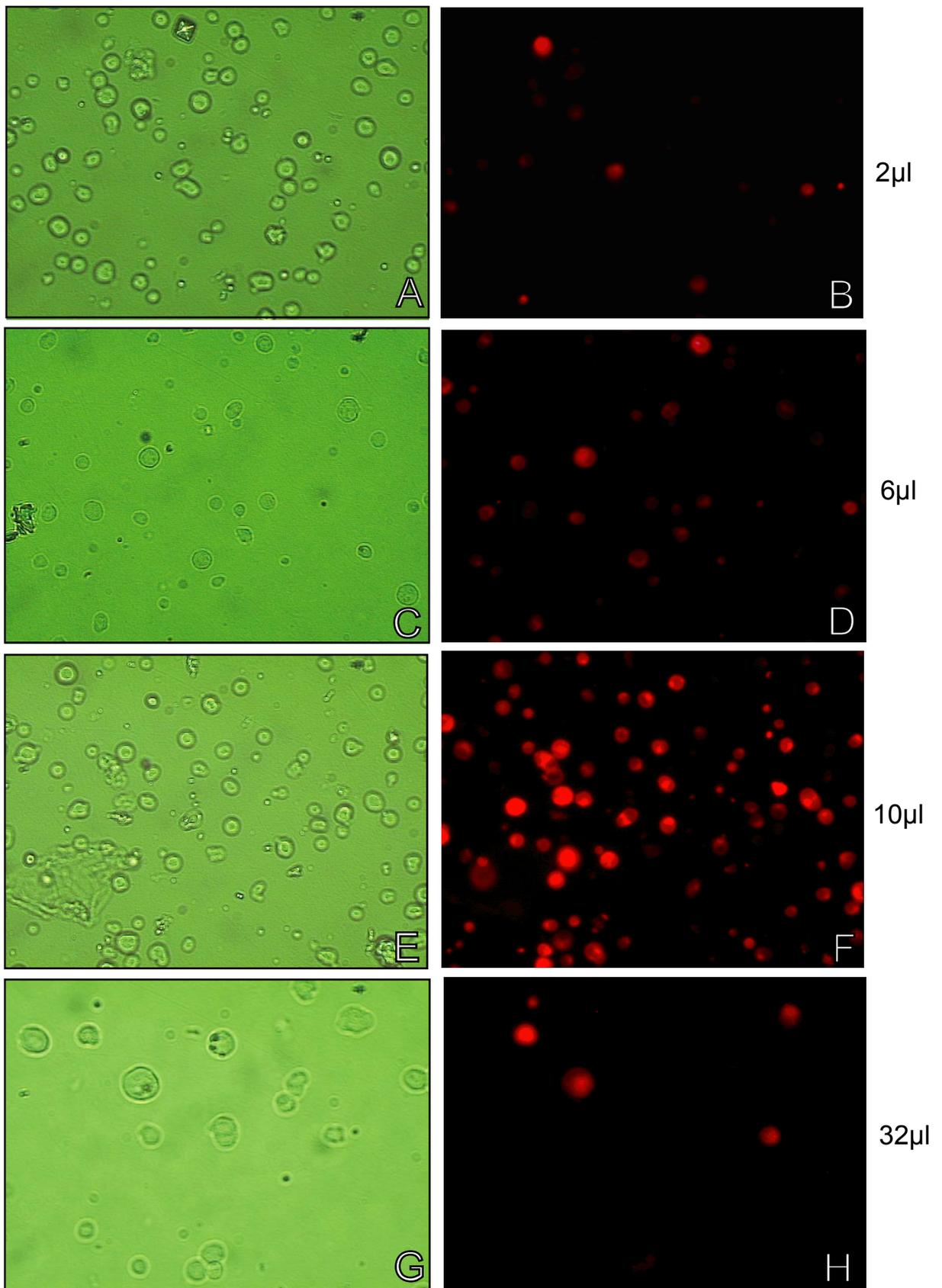


Figura 7 - Marcação de células germinativas com diferentes concentrações (2µl, 6µl, 10µl e 32µl) do corante fluorescente PKH26 e diferentes períodos de incubação. Observe que, além de marcar proporcionalmente poucas células, a concentração de 2µl resultou em fraca intensidade de marcação celular (A-B). Por outro lado, apesar da concentração de 32µl ter proporcionado intensidade de marcação bastante forte (G-H), o número de células marcadas foi pequeno, pelo fato desta concentração ter diminuído bastante a viabilidade celular. Note que intensidade de marcação ótima e boa foi observada, respectivamente, com 10µl e 6µl de PKH26 (C-F). O fato da viabilidade celular ser um pouco melhor com 6µl sugeriu que concentração intermediária, entre 6µl e 10µl de PKH26, provavelmente seria um protocolo viável de marcação de células germinativas a serem transplantadas.

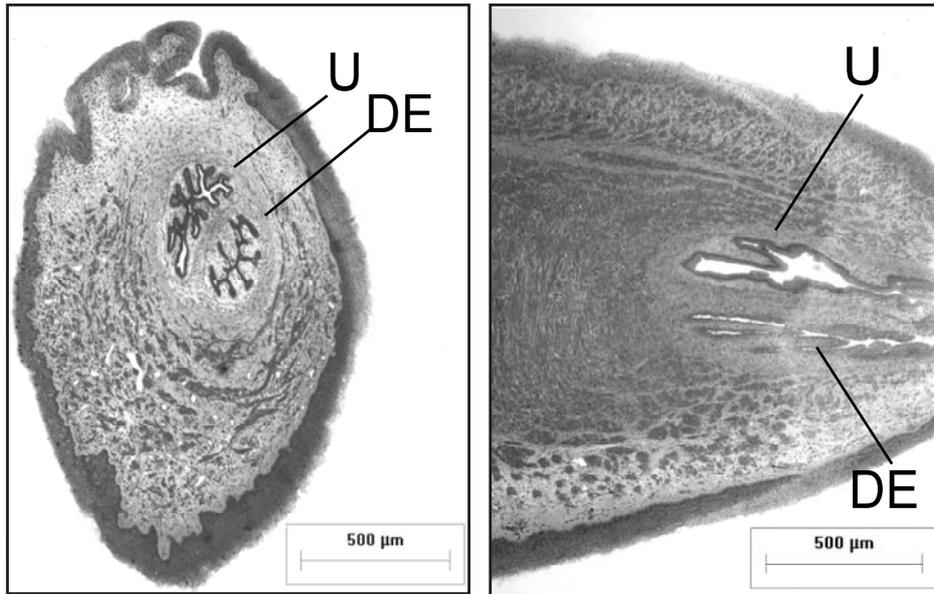


Figura 8 - Disposição e tamanho relativo do ducto uretral e do ducto espermático comum. Observe que o ducto uretral (U; localizado dorsalmente) apresenta tamanho maior do que o ducto espermático comum (DE; localizado ventralmente). De maneira geral, o lume do ducto uretral também se apresenta mais amplo do que o ducto espermático comum. Estes aspectos fazem com que a introdução da cânula seja naturalmente mais direcionada para o ducto uretral.

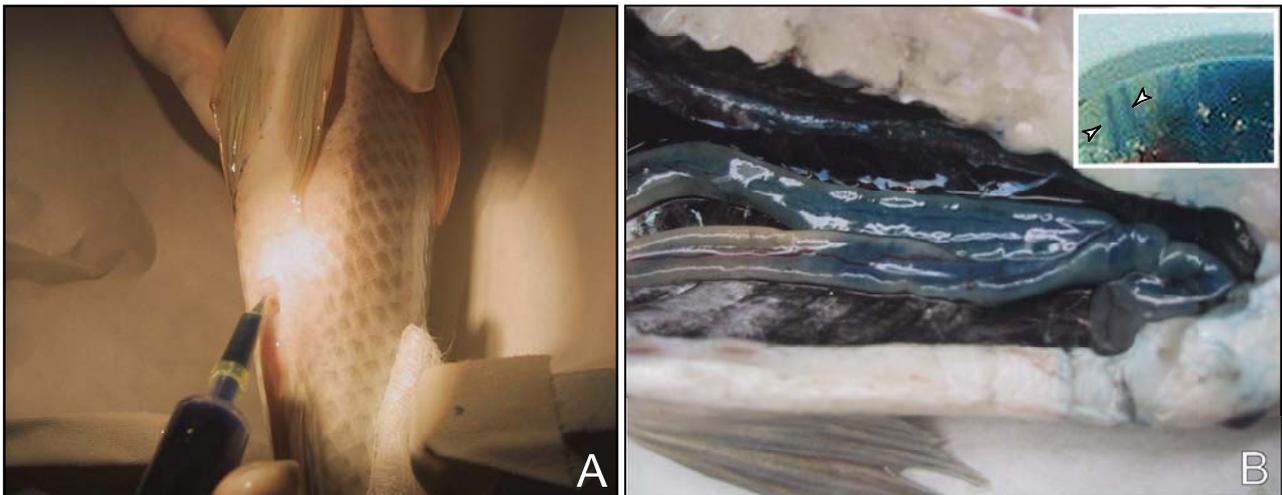


Figura 9 - Esta figura ilustra o procedimento de injeção da solução contendo o corante vital azul de tripan a 0,4% através do ducto espermático comum (A) e a aparência dos testículos das tilápias adultas sacrificadas após a injeção (B). O detalhe em maior aumento, localizado no canto superior direito da Figura B, mostra o lume dos túbulos seminíferos (cabeças de setas) contendo a solução com azul de tripan a 0,4%.

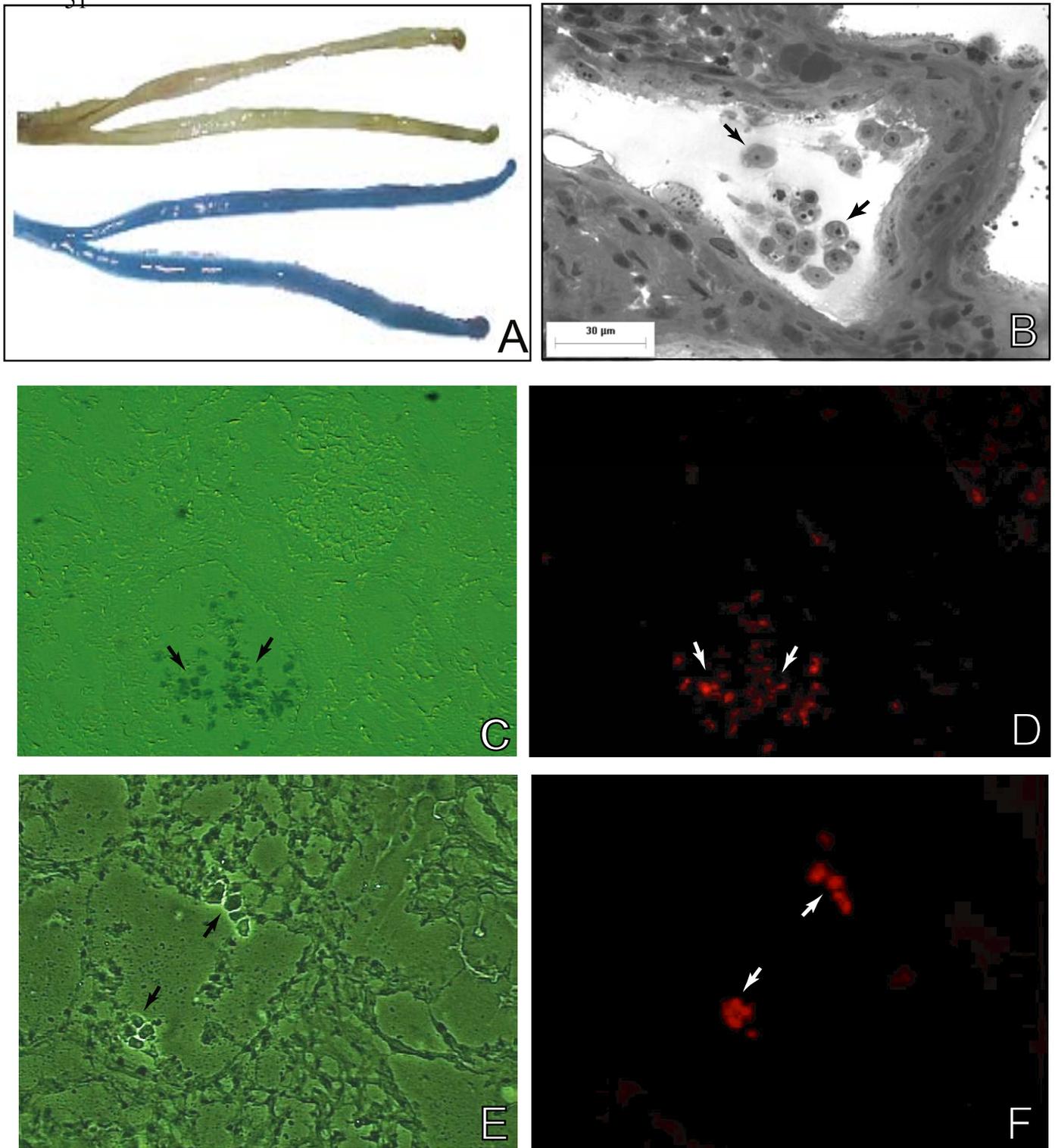


Figura 10 - A figura 10A mostra os testículos das tilápias tratadas com busulfan e mantidas a 35°C. Comparado com as tilápias não transplantadas, nesta figura a eficiência do transplante pode ser comprovada através da coloração azul (parte inferior), nos testículos dos peixes que receberam o transplante de células germinativas marcadas com PKH26 e solução contendo azul de tripan. A figura B ilustra a presença de células germinativas (setas) na luz dos túbulos seminíferos, 14 horas após o transplante. Células germinativas transplantadas presentes nos túbulos seminíferos (setas), 14 horas pós-transplante, também podem ser visualizadas através de microscopia de fluorescência (Fig. 10D e F). As células marcadas com PKH26 podem ser observadas tanto no lume (C-D) quanto em contato com a a parede dos túbulos seminíferos (E-F). Aparentemente, estas células não apresentam arranjo cístico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, N.; MIURA, T.; NADER, M.R.; MIURA, C.; YAMAUCHI, K. A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. *Fisheries Sci*, v.66, n.2, p.299-303, 2000.

AVARBOCK MR, BRINSTER CJ, BRINSTER RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Med* 1996; 2:693-6.

BEAMISH FW. Influence of temperature and salinity acclimation on temperature preference of the euryhaline fish tilapia nilotica. *J Fish. Res. Board Can* 1970; 27:1209-14.

BELLVÉ AR, CAVICCHIA JC, MILLETTE CF, O'BRIEN DA, BHATNAGAR YM, DYM M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. *J Cell Biol* 1977; 74:68-85.

BERNDTSON W E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 1977; 44:818-833.

BILLARD, R. Influence de la température sur la durée et l'efficacité de la spermatogenèse du guppy, *Poecilia reticulata*. *C. R. Acad. (Paris)*, v.206, p.2287-2290, 1968.

BILLARD, R. Spermatogenèse de *Poecilia reticulata* – estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann. Biol. Anim. Bich.Bbiophys.* v.9, p.251-271, 1969.

BILLARD R. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *oecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell Tiss. Res.*, v.237, n.2, p.219-226, 1984.

BILLARD R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Develop* 1986; 26:877-920.

BILLARD R. Spermatogenesis in teleost fish. In: Lamming Ge. (ed). *Reproduction in the male*. Churchill Livingstone 1990: 183-212.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Setor pesqueiro. http://www.setorpesqueiro.com.br/ministerios/ministerio_da_agricultura_e_do_abastecimento/dpa/cadeias_produtivas/tilapia/prod_brasileira.shtm; 200 2.

BRINSTER RL, AVARBOCK MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11303-7.

BRINSTER RL, ZIMMERMANN JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci usa* 1994; 91:11298-302.

BRINSTER RL, NAGANO M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Cell Dev Biol* 1998; 9:401-9.

BRINSTER RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296:2174-75.

BRINSTER CJ, RYN BY, AVARBOCK MR, KARAGENC L, BRINSTER RL. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires efficient recipient preparation. *Biol Reprod.* 2003; 69: 412-420.

BOETTGER-TONG HL, JOHNSTON DS, RUSSEL LD, GRISWOLD MD, BISHOP CE. Juvenile spermatogonial depletion (jsd) mutant seminiferous tubules are capable of supporting transplanted spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 1185-1191.

BUAAS FW, KIRSH AL, SHARMA M, MCLEAN DJ, MORRIS JL, GRISWOLD MD, DE ROOIJ DG, BRAUN RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet.* 2004 ;36(6):551-3.

BUCCI LR, MEISTRICH ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cyto-toxicity, sterility, sperm abnormalities and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987; 178:259-68.

BUNDY DC. Photographic Emulsions And Processing. In: Stumpf we, solomon hf (eds.), *autoradiography and correlative imaging*. First ed., ch. 4. San diego, cl: academic press; 1995: 49-57.

CATZEFLIS F, DICKERMAN A, MICHAUX J, KIRSCH J. DNA Hybridization and rodent phylogeny. In: Szalay F, Novacek M, Mckenna M, Eds. *Mammal Phylogeny*. New York, NY: Springer Verlag; 1993: 159-172.

CELEBI C, AUVRAY P, BENVENU T, PLUSQUELLEC D, JÉGOU B, GUILLAUDEUX T. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells. *Mol Reprod dev* 2002; 62:477-482.

CHIARINI-GARCIA H, HORNICK JR, GRISWOLD MD, RUSSELL LD. Distribution of type a spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod* 2001; 65:1179-85.

CHIARINI-GARCIA H, RAYMER AM, RUSSELL LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction.* 2003 126(5):669-80.

CLOUTHIER DE, AVARBOCK MR, MAIKA SD, HAMMER RE, BRINSTER RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996; 381:418-21.

CREEMERS LB, MENG X, DEN OUDEN K, VAN PELT AM, IZADYAR F, SANTORO M, SARIOLA H, DE ROOIJ DG. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractioned irradiation. *Biol Reprod* 2002; 66:1579-84.

DE FELICE, D.A.; RASCH, E.M. Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in poeciliid fishes. *J. Exp. Zool.*, v.171, p.191-208, 1969.

DE ROOIJ DG, RUSSELL LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid To ask. *J androl* 2000; 21:776-98.

DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 61:1331-39.

DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57:270-9.

DOBRINSKI I, OGAWA T, AVARBOCK MR, BRINSTER, RL. Effect of the gnRH-agonist leuprolide on colonization of recipient testes by donor spermatogonial stem cells after transplantation in mice. *Tiss Cell* 2001; 33:200-7.

DOBRINSKI I. Transplantation. In: skinner mk, griswold md.(eds). *The Sertoli cell biology*.

DOBRINSKI I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2005, 89:137-45.

DYM M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11287-9.

EHMCKE J, LUETJENS CM, SCHLATT S. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. *Biol Reprod*. 2005 ;72(2):293-300.

EGAMI, N., HYODO-TAGUCHI, Y. An autoradiographic examination of rate of spermatogenesis at different temperatures in the fish, *Oryzias latipes*. *Exp. Cell Res.*, v.47, p.665-667, 1967.

ENGLE CR. Economics of tilapia aquaculture. In: Costa-Pierce BA, Rakocy JE (eds). *Tilapia aquaculture in the americas*. The world aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, 1997a: 229-243.

EWING, H.H. Spermatogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Anat. Rec.*, v.172, p.308, 1972.

FAO. Animal Feed Resources Information System. <http://www.fao.org>; 2003

FITZSIMMONS K. Tilapia aquaculture in the Americas. In: Costa Pierce Ba, Rackoy (eds.). *Baton Rouge: World Aquaculture Society*, 2000.p.100-118.

FRANÇA LR. Daily sperm production in piau boars estimated from Sertoli cell population and sertoli cell index. In: International Congress On Animal Reproduction (ICAR), 12, 1992, Netherlands. *Anais. Netherlands: The Hague*, 1992; 1716-1718.

FRANÇA LR, HESS RA, COOKE PS, RUSSELL LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: Evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 1995; 242: 57-69.

FRANÇA LR, CARDOSO F M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Tiss Cell* 1998; 30(5):573-582.

FRANÇA LR, OGAWA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL, RUSSELL LD. germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis. *biol reprod* 1998; 59:1371-7.

FRANÇA LR, RUSSELL LD. The testis of domestic animals. in: *Male Reproduction*. Martínez-García F, Regadera J, eds. Churchill Livingstone, Madrid, Spain, 1998:197-219.

FRANÇA LR, RUSSELL LD. spermatogonial transplantation in mammals. *arbs ann rev biomed sci* 2000; 2:61-76.

FRANÇA LR, SILVA JR VA, CHIARINI-GARCIA H, GARCIA SK, DEBELJUK L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 2000; 63: 1629-1636.

FRANÇA LR, ROCHA DCM, MIRANDA JR, DEBELJUK L. Proliferación de células de sertoli y función testicular. *Boletín Informativo De La Sociedad Argentina De Andrología* 2002; 11:52-57.

FRASER, E.J.; BOSMA, P.T.; TRUDEAU, V.L.; DOCHERTY, K. The effect of water temperature on the gabaergic and reproductive systems in female and male goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.125, n.2, p.163-175, 2002.

FUJITA K, OHTA H, TSUJIMURA A, TAKAO T, MIYAGAWA Y, TAKADA S, MATSUMIYA K, WAKAYAMA T, OKUYAMA A. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1855-61.

GODINHO, C. L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Dissertação de mestrado – Curso De Pós-Graduação Em Biologia Celular Do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG – Belo Horizonte, 1999. 80pp.

GRIER HJ. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: *The Sertoli Cell.* Russell LD, Griswold MD (eds.). Clearwater: Cache River Press. 1993: 703-739.

GRIER, H.J.; NEYDIG, C. Gonads and gametes of fishes. In: t.r. Tiersch; p.m. Mazik, (ed.). *Cryopreservation of aquatic species.* Baton Rouge: The Word Aquaculture Society, 2000. P.1-12.

GRISWOLD MD, MCLEAN D, RUSSELL LD. Promise and limitations of germ cell transplantation in the testis. *J Androl* 2001; 22:713-7.

GIULI G, TOMLJENOVIC A, LABRECQUE N, OULAD-ABDELGHANI M, RASSOULZADEGAN M, CUZIN F. Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. *Embo Rep.* 2002;3: 753 -759.

GUILLAUDEUX T, CELEBI C, AUVRAY P, JÉGOU B. 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, 2000; 59-68.

HAMRA FK, GATLIN J, CHAPMAN KM, GRELLHESL DM, GARCIA JV, HAMMER RE, GARBES DL. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ line stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 2002; 99, 14913-14936.

HAUSLER CL, RUSSELL LD. Prospects for spermatogonial transplantation in livestock and endangered species. In: *The Male Gamete: from basic science to clinical applications.* Gagnon c, ed. Cache River Press, Vienna, il, 1999:37-45.

HESS RA, COOKE PS, BUNICK D, KIRBY JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli cell and germ cell number. *Endocrinology* 1993; 132:2607-13.

HONARAMOOZ, A, MEGEE, S O, DOBRINSKI, I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod* 2002a; 66:21-28.

HONARAMOOZ, A, SNEDAKER A, BOIANI M, SCRÖLER H, DOBRINSKI I, SCHALATT. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, 2002b; 418:778-781.

HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, BLASH S, MEGEE SO, DOBRINSKI I. Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev.* 2003a; 64(4):422-8.

HONARAMOOZ A, BEHBOODI E., MEGEE S.O., OVERTON S.A., GALANTINO-HOMER H.L., ECHELARD Y; DOBRINSKI I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats, *Biol. Reprod.* 69 2003b, pp. 1260–1264.

- HONARAMOOZ A., MEGEE S.O., FOLEY B., DOBRINSKI I. Use of adeno-associated virus for transfection of male germ cells for transplantation in pigs, *Theriogenology* 59 2003c, p. 536.
- HONARAMOOZ A, BEHBOODI E, HAUSLER CL, BLASH S, AYRES S, AZUMA C, ECHELARD Y, DOBRINSKI I. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *Journal of Andrology* 2005, 26(6):698-705.
- HORAN, P.K., SLEZAK, S.E. Stable cell membrane labelling. *Nature* 1989, 340, 167–168.
- IZADYAR F, CREEMERS LB, VAN DISSEL-EMILIANI FMF, VAN PELT AMM, DE ROOIJ DG. Spermatogonial stem cell transplantation. *Mol Cell Endocrin* 2000; 169:21-6.
- IZADYAR F, DEN OUDEN K, STOUT TA, STOUT J, CORET J, LANKVELD DP, SPOORMAKERS TJ, COLENBRANDER B, OLDENBROEK JK, VAN DER PLOEG KD, JOHNSTON DS, RUSSELL LD, FRIEL PJ, GRISWOLD MD. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology* 2001; 142:2405-8.
- 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. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 2003 126(6):765-74
- KHAIRA H, MCLEAN D, OHL DA, SMITH GD. Spermatogonial stem cell isolation, storage, and transplantation. *J Androl*. 2005 ;26(4):442-50
- KIM Y, SELVARAJ V, DOBRINSKI I, LEE H, MCENTEE MC, TRAVIS AJ. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. *Journal of Andrology*, 2005
- KOH K-B, KOMIYAMA M, TOYAMA Y, ADACHI T, MORI C. Percoll fractionation of adult mouse spermatogonia improves germ cell transplantation. *Asian j. Androl*, 2004; 6: 63-98.
- KOULISH S, KRAMER CR, GRIER HJ. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol* 2002; 254:292-311.
- KUBOTA H, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Spermatogonial stem cell share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 2003,100, 6487-6492.
- KUROHMARU M, KANAI Y, HAYASHI Y. Cytological and cytoskeletal comparison of sertoli cells without germ cells and those with germ cells using the w/wv mutant mouse. *Tiss Cell* 1992; 24:895-903.
- LE GAC F, LOIR M. Male reproductive system, fish. In: Knobil E, Neill Jd (ed.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press 1999; 3:20-30.
- LOVSHIN LL, CYRINO PEP. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: *Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes*, 2.ed, Piracicaba, 1998. Anais. Campinas: CBNA, 1998. P. 1-20.
- MAHATO D, GOULDING EH, KORACH KS, EDDY EM. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- α for development or function. *Endocrinology* 2000; 141:1273-75.
- MAINARDES-PINTO CSR, VERANI JR; ANTONIUTTI DM. Estudo comparativo do crescimento de machos de *Oreochromis niloticus* em diferentes períodos de cultivo. *Boletim Do Instituto de Pesca*, v.22, p.73-87, 1995.

MATTA SLP. Efeito do hipotireoidismo induzido pelo PTU (6-n-propil-2-tiouracil) sobre a proliferação de células de sertoli e germinativa em tilápias (*Oreochromis niloticus*). Belo Horizonte: UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 2000. 108p. Tese (doutorado).

MATTA SLP, VILELA DAR, GODINHO HP, FRANÇA LR. 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* 2002; 143:970-78.

MCLEAN D, JOHNSTON DS, RUSSELL LD, GRISWOLD MD. Germ cell transplantation and the study of testicular function. *Trends Endocrin Met* 2001; 12:16-21.

MCLEAN D, RUSSELL LD, GRISWOLD MD. 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* 2002; 66:1374-1379.

MCLEAN D. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res.* 2005; 322(1):21-31.

MEACHEM S, VON SCHÖNFELDT V, SCHLATT S. Spermatogonia: stem cell with a great perspective. *Reproduction* 2001; 121:825-834.

MINTZ B, RUSSELL ES. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells In the mouse. *J Exp Zool* 1957; 134:207-237.

MIURA, T. Spermatogenic cycle in fish. In: Knobil, E., Neill, J.D. (ed.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, 1999. V.4, p.571-578.

MOISAN AE, FOSTER RA, BETTERIDGE KJ, HAHNEL AC. Dose-response of *rag2^{-/-} c^{-/-}* mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction*. 2003; 126: 205-216.

NAGANO M, AVARBOCK MR, LEONIDA EB, BRINSTER CJ, BRINSTER RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tiss Cell* 1998; 30:389-97.

NAGANO M, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Rprod* 1999; 60:1429-36.

NAGANO M, SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Retrovirus- mediated gene delivery into male germ line stem cell. *Febs Lett.* 2000; 475,7-10.

NAGANO M, BRINSTER CJ, ORWIG KE, RYU BY, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001a; 98:13090-5.

NAGANO M, MCCARREY JR, BRINSTER RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol Reprod* 2001b; 64:1409-1416.

NAGANO M, WATSON DJ, RYU BY, WOLFE JH, BRINSTER LR. Lentiviral vector transduction of male germ line stem cell in mice. *Febs Lett.* 2002a; 524, 111- 115.

NAGANO M, PATRIZIO P, BRINSTER LR. Long term survival of humam spermatogonial stem cell in mouse testes. *Fertil. Steril.* 2002b; 78, 1225-1233

NELSON JS, *Fishes of The World*, 1984 John Wiley & Sons, Inc (ed.) . 1984. 523p.

OATLEY, JM, TIBARY A, DE AVILA DM, WHEATON JE, MCLEAN DJ, REEVES JJ. Changes in spermatogenesis and endocrine unction in the ram testis due to irradiation and active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *J Anim Sci.* 2005; 83: 604 -612.

OGAWA T, ARÉCHAGA JM, AVARBOCK MR, BRINSTER LR. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41:111-22.

OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 60:515-21.

OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Med* 2000; 6:29-34.

ORTAVANT R, COUROT M, HOCHEREAU-DE-REVIERS MT. Spermatogenesis in domestic animals. In: Cole Hh, Cupps P T (ed.) *Reproduction in domestic animals.* 3 ed. New York: Academic Press, 1977. Cap. 8, p. 203-227.

ORWING KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Retrovirus- mediated modification of male germline stem cell in rats. *Biol. Reprod.* 2002, 64:874-879.

OHTA H, YOMOGIDA K, YAMADA S, OKABE M, NISHIMUNE Y. Real-time observation of transplanted 'green cells': proliferation and differentiation of stem cells. *Dev Grow Differ* 2000; 42:105-12.

OKUTSU T, SUZUKI K, TAKEUCHI Y, TAKEUSHI T, YOSHISAKI G. Testicular germ cell can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *PNAS* 2006: In Press.

PARREIRA GG, OGAWA T, AVARBOCK MR, FRANÇA LR, BRINSTER RL, RUSSELL LD. Development of germ cell transplants in mice. *Biol Reprod* 1998; 59:1360-70.

PARREIRA GG, OGAWA T, AVARBOCK MR, FRANÇA LR, HAUSLER C, BRINSTER RL, RUSSELL LD. Development of germ cell transplantation: morphometric and ultrastructural studies. *Tiss Cell* 1999; 31:242-254.

PUDNEY, J. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate sertoli cell. In: *The Sertoli cell.* Russell, L.D., Griswold, M.D (ed.). Clearwater: Cache River Press. 1993. p.612-657.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.*, v.6, p.459-497, 1995.

QUAGIO-GRASSIOTO, I.; CARVALHO, E.D. The ultrastructure of sorubim lima (teleostei, siluriformes, pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tiss. Cell.*, v.31, n.6, p.561-567, 1999.

RATHI R., HONARAMOOZ A., ZENG W., TURNER R., DOBRINSKI I., Testis tissue xenografting as a bioassay for germ cell developmental potential in equine cryptorchid testes, *Reprod. Fertil. Dev.* 17 (2005), p. 283

REIS MM, TSAI MC, SCHLEGEL PN, FELICIANO M, RAFFAELLI R, ROZENWAKS Z, PALERMO GD. Xenogeneic transplantation of human spermatogonia. *Zigote.* 2000. 8 97-105

RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis.* Cache River Press, Clearwater, Fl, 1990. 286p.

RUSSELL LD, GRISWOLD MD. The Sertoli cell. Cache River Press, Clearwater, fl, 1993, 801p.

RUSSELL LD, SINHA-HIKIM AP, GHOSH S, BARTKE A. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: Bartke A (ed.). Function of somatic cells in the testis. Norwell: Springer-Verlag, 1994. Cap. 3. P.55-83.

RUSSELL LD, FRANÇA LR, BRINSTER RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. J Androl 1996; 17:603-14.

SCHLATT S, ROSIEPEN G, WEINBAUER GF, ROLF C, BROOK PF, NIESCHLAG E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. Hum Reprod 1999; 14:144-50.

SCHLATT S, FOPPIANI L, ROLF C, WEINBAUER GF, NIESCHLAG E. Germ cell transplantation into x-irradiated monkey testes. Hum Reprod 2002; 17, 55-62.

SCHULZ R.W. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. ARBS Annual Review of Biomedical Sciences 2003; 5, 57-58.

SCHULZ RW, MENTING S, BOGERD J, FRANCA LR, VILELA DA, GODINHO HP. Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. Biol Reprod. 2005 nov; 73(5):891-8.

SHARPE RM, MCKINNELL C, KIVLIN C, FISHER JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction. 2003; 125(6):769-84.

SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. b1- and a6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:5504-9.

SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. Dev Biol 2000; 220:401-11.

SHINOHARA T, BRINSTER RL. Enrichment and transplantation of spermatogonial stem cells. Int J Androl 2000 suppl 2; 23:89-91.

SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. Proc Natl Acad Sci USA 2001 22; 98(11):6186-91

SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes. Biol Reprod. 2002 ;66(5):1491-7.

SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. Biol Reprod. 2003 68(3):1064-71.

SHUTTLESWORTH GA, DE ROOIJ DG, HUHTANIEMI I, REISSMANN T, RUSSELL LD, SHETTY G, WILSON G, MEISTRICH ML. Enhancement of a spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. Endocrinology. 2000; 141: 37 -49.

SILVA M, GODINHO HP. Timing of some events of the gametogenesis in the male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Arch Anat Mic 1983; 72:231-237.

SILVA, M. Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemotesticular da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*. Tese (doutorado) – curso de pós-graduação em biologia celular do instituto de ciências biológicas da ufmg – Belo Horizonte, 1987. 164p.

STICKNEY RR. Tilapia Culture. In: Stickney, R.R. (ed.). Encyclopedia of Aquaculture, New York: John Wiley & Sons, 2000. p.934-941.

TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G, TAKEUSHI T. Generation of live fry from intraperitoneally primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 2003; 69: 1142-1149.

TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G, TAKEUSHI T. Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 2004; 430: 629-630.

TREWAVAS E. TILAPIINE Fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum of Natural History, London, 1983.

TORRANS L. Blue tilapia culture in arkansas. Pine Bluff: Cooperative Extension Service Program Publication University of Arkansas, 1998.

TURNER, C.L. The Seasonal Cycle In The Spermary Of The Perch. *J. Morph.*, v.32, p.681-711, 1919.

TURNER R, RATHI R, HONARAMOOZ A, ZENG W.; DOBRINSKI I, Germ cell development in equine testis tissue xenografted into mice, *Reprod. Fertil. Dev.* 17 (2005), pp. 283–284.

VECINO P, URANGA JA, ARECHAGA J. Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. *Protoplasma* 2001; 217: 191-8.

VAN DEN AARDWEG GJ, DE RUITER-BOOTSMA AL, KRAMER MF, DAVIDS JA Growth and differentiation of spermatogenic colonies in the mouse testis after irradiation with fission neutrons. *Radiat Res.* 1983 ;94(3):447-63.

VAN STRAATEN HWM, WENSING CJG. Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in pig. *Biol Reprod.* 1977; 17: 467 -472

VILELA DAR. 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 (mestrado) – curso de pós-graduação em biologia celular da escola de veterinária ufmg – belo horizonte, 2003. 74p.

VILELA DAR, SILVA SGB, PEIXOTO MTD, GODINHO HP, FRANÇA LR. Spermatogenesis in teleost: insights from the nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiology And Biochemistry*,2003,28, 187-190.

SETCHELL, B.P. Heat And The Testis. *J. Reprod. Fertil.*, v.114, p.179-194, 1998.

SILVA SGB, PEIXOTO MTD, GODINHO HP, FRANÇA LR. Spermatogenesis in teleost: insights from the nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiology And Biochemistry*,2003,28, 187-190.

VAUPEL, J. The spermatogenesis of *Lebistes reticulatus*. *J. Morph.*, v.47, p.555-587, 1929.

VAN DEN HURK, R.; PEUTE, J.; VERMEIJ, J.A.J. Ultrastructural study of the testis of the black molly (*Mollienisia latipinna*) i. the intratesticular efferent duct system. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. Ser.*, v.77, p.460-469, 1974.

WOELDERS H, KAL HB, DE ROOIJ DG. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction.* 2003; 126: 765 -774.

WEGLARZ TC, SANDGREN EP. Timing of hepatocyte entry into dna synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. PNAS 2000; 97:12595-00.

WELTZIEN F-A, ANDERSSON E, ANDERSEN Ø, SHALCHIAN-TABRIZI K, NORBERG B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). Comparative Biochemistry And Physiology - part a: Molecular & Integrative Physiology 2004, 137, 3: p 447-477

YU, K.L.; PETER, R.E. Dopaminergic regulation of brain gonodotropin-releasing hormone in Malegoldfish during spawning behaviour. Neuroendocrinol., v.52, p.276-283, 1990.