TÚLIO TERUO YOSHINAGA

**Efeitos de imunossupressores sobre o sistema imunológico em transplantes
de células germinativas em trutas arco-íris**

São Paulo

2018

TÚLIO TERUO YOSHINAGA

Efeitos de imunossupressores sobre o sistema imunológico em transplantes de células germinativas em trutas arco-íris

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

Co-Orientador:

Dr. Ricardo Shohei Hattori

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3628
FMVZ

Yoshinaga, Túlio Teruo
Efeitos de imunossupressores sobre o sistema imunológico em transplantes de células germinativas em trutas arco-íris. / Túlio Teruo Yoshinaga. -- 2018.
53 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.
Co-orientador: Dr. Ricardo Shohei Hattori.

1. Transplantes de células germinativas. 2. Imunossupressão. 3. Reprodutores substitutos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos de imunossupressores sobre a colonização e diferenciação de células germinativas transplantadas em salmonídeos", protocolado sob o CEUA nº 1589150216, sob a responsabilidade de **José Roberto Kfoury Júnior e equipe; Túlio Teruo Yoshinaga; Ricardo Shohei Hattori** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 01/06/2016.

We certify that the proposal "Immunosuppressants' effects in colonization and differentiation of germ cell transplantation in salmonids", utilizing 200 Fishes (males and females), protocol number CEUA 1589150216, under the responsibility of **José Roberto Kfoury Júnior and team; Túlio Teruo Yoshinaga; Ricardo Shohei Hattori** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 06/01/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2016** a **03/2018**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Procedência: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 365 dias**

N: **200**

Linhagem: **Jordanense, Shasta, Golden, Azul**

Peso: **1 a 2000 g**

Resumo: As gônadas são órgãos imunoprivilegiados e aproveitando-se disso, foi desenvolvido a técnica de reprodutores substitutos, que permite geração de gametas alógenos através do transplante de células germinativas indiferenciadas de um doador nas gônadas de uma espécie hospedeira diferente. Essa ferramenta pode ser aplicada para conservação de espécies ameaçadas de extinção, na produção de espécies comerciais ou que demandam muito tempo e esforço para produção.

No entanto, a baixa eficiência na produção de gametas derivados do animal doador tem restringido a utilização da tecnologia de reprodutores substitutos em uma escala comercial. Acredita-se que um processo de rejeição, não só em adultos, mas também em embriões, seja responsável por essa baixa eficiência e que, portanto, estaria limitando maior aplicação deste método de produção.

A imunossupressão do hospedeiro poderia ser uma forma de aumentar a eficiência da colonização das células transplantadas. A utilização de drogas imunossupressoras levaria à redução ou bloqueio de mecanismos de ativação ou proliferação de células do sistema imunológico. Baseado nas considerações acima descritas, este trabalho visa avaliar o efeito da utilização de drogas imunossupressoras sobre a eficiência dos transplantes de células germinativas usando dois salmonídeos como modelo. Para tanto será verificado inicialmente as alterações sobre mecanismos de resposta na imunidade e gametogênese e em seguida será avaliado os efeitos da imunossupressão sobre a colonização, proliferação e diferenciação das células germinativas transplantadas.

Local do experimento: Unidade de pesquisa e desenvolvimento de Campos do Jordão e laboratório de Técnicas imunológicas aplicadas a morfofisiologia da Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 02 de junho de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 06 de dezembro de 2017
CEUA N 1589150216

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: José Roberto Kfoury Júnior

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

José Roberto Kfoury Júnior (orientador)

Título da proposta: "Efeitos de imunossuppressores sobre o sistema imunológico em transplantes de células germinativas em trutas arco-íris".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 06/novembro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "A técnica de transplantes de células germinativas pode ser aplicada na reprodução de espécies comerciais e na conservação daquelas ameaçadas de extinção. No entanto, a maior limitação está na sua baixa eficiência, uma vez que, a porcentagem de hospedeiros gerando gametas xenógenos assim como a quantidade de gametas produzidos são bem baixas. Acredita-se que mecanismos de rejeição do hospedeiro estejam envolvidos nesta baixa eficácia da técnica. Neste trabalho avalia-se que a imunossupressão do hospedeiro pela administração de drogas imunossupressoras possa aumentar a eficiência dos transplantes de células germinativas. "

Comentário da CEUA: "Foi solicitado a troca de título do projeto. "

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Folha de Avaliação

Autor: YOSHINAGA, Túlio Teruo

Título: Efeitos de imunossupressores sobre o sistema imunológico em transplantes de células germinativas em trutas arco-íris

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Valéria e aos meus irmãos, Thomás, Tiemi e Tássio. Mesmo que cada um de nós esteja trilhando seu próprio caminho, nós sempre seremos família. Quero dedicar este trabalho especialmente à dona Nita e à memória do Sr. Neres, vocês me acolheram como um filho quando saí de casa e quero que saibam que vocês sempre estarão no meu coração. Dedico este trabalho à Yara san, à Rosana, ao Lé, ao Purginha, à Neusa san, ao Tsukamoto san e os meus dois orientadores, sensei José Roberto Kfoury Júnior e sensei Ricardo Shohei Hattori, por acreditarem no meu esforço e trabalho para concluir mais esta etapa. Obrigado pelo apoio e pela confiança depositada nesses dois anos, e que venha o doutorado.

Agradecimentos

Agradeço à minha família por me apoiar nesta empreitada e mesmo de longe, sempre torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus dois orientadores, sensei José Roberto Kfoury Júnior e sensei Ricardo Shohei Hattori, pela oportunidade, pela amizade, pela paciência e conhecimento. Obrigado pela confiança e acreditarem no meu trabalho e no meu esforço.

Aos amigos Alex Sander Dias Machado e à Thaís Peixoto Gaiad Machado, graças à vocês consegui chegar até aqui. Quem diria que construir uma rampa de cimento poderia criar uma oportunidade destas.

Ao meu irmão e grande amigo Pedro Kastein Faria da Cunha Bianchi. Obrigado pelo apoio ao longo desses dois anos e à você desejo todo o sucesso e felicidade do mundo meu grande irmão.

À Yara san por ser uma mãe para mim nestes dois anos. Seus conselhos, ensinamentos e filosofia de vida sempre serão uma inspiração para mim.

À Rosana por também ser uma mãe, lembarei de cada puxão de orelha, das risadas no café da manhã e dos seus conselhos.

Aos amigos Lé e Purginha que sempre estiveram presentes durante esta jornada, aprendi muito com vocês e com certeza tenho mais à aprender.

Aos amigos e irmãos de batalha, Renan Ollio, Juliana Ferrão e Bruno Marotta pela amizade e ajuda durante a fases difíceis deste trabalho. Pessoas como vocês tornam o mundo um lugar melhor para viver, e podem contar comigo sempre que precisarem.

A todos aos amigos que fiz nestes dois anos, Aline Poscai, Renata Santos Silva, Nathália Paulino, Flávia Ponce, Carla Soares, Lucas Simões Machado, Patrícia Romagnolli, Antônio Lisboa Neto, Cecília Benazatto, Fausto Fernandes, Bruna Andrade, Andressa Cereta, Rafaela Coeti, Aline Cadorini, Daiana Lima, Iran Augusto, Arno Butzge, Gabriel Marra, Jonathan Pena Castro, Antônio Bordignon, Rafael Hayashi, Diogo Palermo, João Leonardo, Ronaldo Agostinho da Silva.

Aos professores, Roberto Ferreira Artoni, Renata Guimarães Moreira Whitton, Mariana Matera Veras, Patrícia Cristina Baleiro Beltrão Braga e Antônio Chaves de Assis.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento.

Muito obrigado a todos vocês.

Resumo

YOSHINAGA, T.T. Efeitos de imunossupressores sobre o sistema imunológico em transplantes de células germinativas em trutas arco-íris

Os transplantes de células germinativas e enxertos de testículo podem ser aplicados na reprodução de espécies comerciais e na conservação de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, a maior limitação dos transplantes está na sua limitada eficiência, devido à baixa porcentagem de hospedeiros capazes de gerar gametas derivados do doador e da rejeição de enxertos de testículo alogênicos após poucas semanas de sua implantação. O sistema imunológico dos hospedeiros podem estar envolvidos na baixa de eficiência dos transplantes e na rejeição dos enxertos. Desta forma, este trabalho buscou verificar se a administração de drogas imunossupressoras como o tacrolimus e ciclosporina em emulsão poderiam ser utilizados para prolongar a viabilidade de enxertos de testículo em trutas arco-íris. Na primeira parte, experimentos *in vitro* com leucócitos do sangue periférico demonstraram que ambos o tacrolimus e a ciclosporina impedem a proliferação celular mesmo sob estímulo proliferativo da concanavalina. Nos ensaios *in vivo*, ambas as doses de tacrolimus (0,5 e 1,5 mg/kg) e a mais baixa de ciclosporina (20 mg/kg) inibiram significativamente a expressão de *il2* no rim cefálico três dias após a injeção. Já a dose de 40 mg/kg de ciclosporina inibiu a expressão de *il2* por até sete dias após a injeção. Na segunda parte, enxertos alogênicos de testículo foram realizados em animais tratados semanalmente com emulsões de tacrolimus. As análises histológicas (coloração H.E.) e as de RT-PCR (*vasa* e *txdnc6*) demonstraram a presença de espermatogônias na primeira semana e indicaram a presença de espermatídes/espermatócitos na quinta semana, respectivamente, em alguns animais do grupo tratado com a dose de 0,5 mg/kg de tacrolimus. No grupo tratado com a dose mais alta de tacrolimus (1,5 mg/kg) e no grupo controle (sem imunossupressor), células germinativas ou marcadores destas não foram detectados. Estes resultados, portanto, fazem do tacrolimus um imunossupressor promissor para utilização em enxertos alogênicos e também em transplantes de células germinativas de truta arco-íris. A administração concomitante de um outro imunossupressor conjugado ao tacrolimus (na baixa dosagem) para inibir duas ou mais vias de ativação do sistema imunológico, conforme utilizado em transplantes de órgãos em humanos, pode ser uma alternativa para otimizar os efeitos imunossupressivos nos animais receptores.

Palavras-Chave – Reprodutores substitutos, imunossupressão, transplante de células germinativas.

Abstract

YOSHINAGA, T.T – Effects of immunosuppressants on immune system in germ cell transplantation in rainbow trout

Germ cell transplantation and testis graft can be applied for the reproduction of commercial or endangered species. However, mechanisms of rejection from the host immune system might limit the production of surrogate gametes and progeny after transplantation and induce rejection of testis allografts within few weeks. In this work, we aimed to administer immunosuppressants-containing emulsions in order to verify whether they are capable to prevent immune rejection and promote testis allograft survival in rainbow trout. In the first part of this study, it was demonstrated *in vitro* that tacrolimus and cyclosporine were able to inhibit leucocyte proliferation even under concanavalin-induced mitotic stimulation. In *in vivo* experiments, both dosage of tacrolimus (0,5 and 1,5 mg/kg) and a lower of cyclosporine (20 mg/kg) inhibited significantly the expression of *il2* in head kidney at three days post-injection. A higher dosage of cyclosporine (40 mg/kg) was able to inhibit *il2* expression for up to seven days post-injection. In the second part, testis allografts were conducted in fish treated weekly with tacrolimus-containing emulsions. Histological (H.E. staining) and RT-PCR (*vasa* and *txdnc6*) analysis demonstrated the presence of spermatogonias in the first week and indicated the presence of spermatids/spermatocytes in the fifth week, respectively, in some animals treated with 0,5 mg/kg of tacrolimus. In the group treated with the highest tacrolimus dose (1,5 mg/kg) and in the control group (without immunosuppressant), no germ cells or their respective markers were detected. These results suggest that tacrolimus comprise a promising immunosuppressant, with applications to testis allografts or germ cell transplantation in rainbow trout. Co-administration combining tacrolimus (at lower dose) with other immunosuppressive drugs for inhibiting more than two activation pathways of the immune system, as done in human organ transplantation, can be an alternative to optimize the immunosuppressive effects in host organisms.

Keywords – Surrogate broodstock, immunosuppression, germ cell transplantation.

Sumário

1	Introdução Geral	12
2	Efeitos do tacrolimus e da ciclosporina sobre o sistema imunológico em trutas arco-íris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	20
2.1	Introdução.....	20
2.2	Materiais e métodos	21
2.3	Resultados	25
2.4	Discussão.....	28
2.5	Considerações.....	30
2.6	Referências Bibliográficas	30
3	Efeitos da administração de tacrolimus em enxertos de testículo em truta arco-íris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	32
3.1	Introdução.....	32
3.2	Materiais e métodos.....	33
3.3	Resultados	37
3.4	Discussão.....	41
3.5	Considerações.....	43
3.6	Referências bibliográficas.....	44
4	Considerações finais	47
	Referências Bibliográficas	47

1 Introdução Geral

1.1 Transplantes de células germinativas ou barriga de aluguel

Células germinativas são uma pequena população de células isoladas durante o desenvolvimento embrionário que dão origem aos espermatozóides e ovócitos. (WYLIE, 1999). Elas possuem a capacidade de auto-renovação, assim como as células hematopoiéticas, epitélio intestinal e a pele (POTTEN, 1992). Durante a espermatogênese, algumas espermatogônias mantém o número de células progenitoras da população durante a vida adulta do indivíduo e outras se diferenciam em espermatozóides (YOSHIDA, 2010). Células germinativas possuem alta plasticidade e podem ser transplantadas entre espécies diferentes, permitindo a produção de gametas alógenos derivados do doador (TAJIMA et al., 1993; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994). Transplantes em peixes demonstraram que células germinativas podem migrar da cavidade celomática de embriões para o primórdio gonadal (OKUTSU et al., 2007) e espermatogônias podem migrar do lúmen para a região cranial em animais adultos (MAJHI et al., 2009). Os transplantes de células germinativas foram demonstrados em diversas espécies de mamíferos e aves, sendo utilizada como ferramenta reprodutiva para produção animal ou método para restauração de fertilidade (BUEHR et al., 1993; HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002; KANATSU-SHINOHARA et al., 2003; KANG et al., 2008; HERRID et al., 2009).

Em peixes, os primeiros transplantes foram demonstrados em salmonídeos, nos quais trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram produzidas pelo transplante de células germinativas em embriões de salmão masu (*Oncorhynchus masou*) (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2004). Posteriormente, ovócitos funcionais e proles de trutas arco-íris foram produzidos pelo transplante em animais triploides de salmão masu (OKUTSU et al., 2007). A partir de então, diversas outras espécies de peixes começaram a ser reproduzidas por barriga de aluguel em embriões e em animais adultos, como por exemplo o peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) (MAJHI et al., 2009, 2014), a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FARLORA et al., 2014; SILVA et al., 2016), o atum do rabo amarelo (*Seriola quinqueradiata*) (MORITA et al., 2012, 2015), o medaka (*Oryzias latipes*) (SEKI et al., 2017) e o fugu (*Takifugu rubripes*) (HAMASAKI et al., 2017).

Transplantes de células germinativas podem ser realizados nos primeiros estágios embrionários (SAITO et al., 2008). Transplantes neste estágio geram quimeras e células germinativas transplantadas também são capazes de migrar para o primórdio gonadal, sofrer

gametogênese e produzir proles derivadas do doador (WONG et al., 2011). Outro método de transplante consiste no enxerto de tecido gonadal, onde o testículo ou parte dele pode ser enxertado ou transplantado em outro indivíduo (BHATTA et al., 2012). Enxertos de testículo em trutas arco-íris isogênicas são capazes de sofrer maturação e produzir espermatozóides viáveis (NAGLER et al., 2001). Da mesma forma, ovários destacados da sua posição original podem restabelecer a vascularização e manter seu desenvolvimento normalmente (CLOUD, 2003).

Em vista disso, a técnica de barriga de aluguel é uma promissora ferramenta reprodutiva com aplicações na conservação de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (MAJHI; KUMAR, 2017), no estudo de espécies com biologia reprodutiva desconhecida (SILVA et al., 2016) e na produção de espécies de grande porte ou com longo ciclo reprodutivo (MORITA et al., 2015; SAITO; PSENICKA, 2015).

1.2 Eficiência dos transplantes de células germinativas e o imunoprivilégio do testículo

Transplantes de células germinativas em peixes demonstraram altas taxas de colonização. Porém, as taxas de indivíduos capazes de produzir gametas derivados do doador são inferiores a 30% (OKUTSU et al., 2006; MAJHI et al., 2009; MORITA et al., 2012; FARLORA et al., 2014). Nos casos reportados, os animais utilizados como recipientes são diploides e produzem seus próprios gametas, o que afeta a produção de gametas alógenos, ou seja, derivados de células transplantadas. Para contornar este problema, animais triploides foram utilizados como receptores, já que estes são geralmente estéreis devido à divisão irregular dos cromossomos durante a meiose (PIFERRER et al., 2009). Fêmeas triploides de trutas arco-íris produzem apenas ovócitos derivados das células transplantadas (OKUTSU et al., 2007). Já os machos triploides são capazes de produzir espermatozóides aneuploides que, embora ativem os ovócitos, geram embriões inviáveis que morrem antes mesmo da eclosão (LEE et al., 2013). No caso do fugu, os triploides também não são totalmente estéreis e, tanto o macho como a fêmea, retêm a capacidade de produzir gametas (HAMASAKI et al., 2013).

A gametogênese em animais transplantados depende de certas compatibilidades entre doador e receptor. A oogênese em transplantes intergenéricos depende de interações entre as células germinativas transplantadas com as células da granulosa ou teca (PATIÑO; SULLIVAN, 2002; KAGAWA, 2013), fazendo com que a produção de ovócitos através de transplantes seja mais complexa. Já a espermatogênese parece ser um processo que não depende tanto desta compatibilidade, como demonstrado em alguns transplantes entre espécies distantes

filogeneticamente (MORITA et al., 2015; SILVA et al., 2016). O testículo possui características morfológicas como barreira sangue-testículo e respostas imunológicas limitadas que provavelmente o permitam aceitar células transplantadas sem haver rejeição celular (LI; WANG; HAN, 2012; STEIN-STREILEIN; CASPI, 2014).

O testículo é um dos diversos órgãos considerados imunoprivilegiados, onde antígenos estranhos são tolerados sem a indução de uma resposta imunológica (KAUR; MITAL; DUFOUR, 2013). Nos vertebrados, a produção e diferenciação dos espermatozóides ocorre depois maturação do sistema imunológico, o que implica na produção de diversas novas proteínas imunogênicas que são toleradas pelo sistema imunológico (FIJAK; MEINHARDT, 2006). Essa capacidade de tolerar células alogênicas e xenogênicas permitiu o sucesso de transplantes de células germinativas entre algumas espécies (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994). O imunoprivilegio é uma característica evolutiva para proteger tecidos com capacidade limitada de regeneração e perda de função. Assim, mesmo depois de um grande dano, o testículo pode reter a capacidade reprodutiva de um indivíduo (MADDOCKS; SETCHELL, 1990). As células de Sertoli desempenham um papel fundamental na criação do ambiente imunoprivilegiado do testículo dos mamíferos e esse mecanismo pode estar também presente no testículo dos peixes (LACERDA et al., 2013)

O testículo dos salmonídeos possui estrutura tubular, com ductos eferentes ramificados. As células de Sertoli rodeiam as células germinativas, criando um ambiente isolado por uma barreira permeável (GRIER, 1981). A comunicação entre as células germinativas e as células de Sertoli são controladas pelos hormônios do eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-testículo, que regulam a espermatogênese (BILLARD et al., 1982). Ainda que células germinativas estejam isoladas do resto do corpo, células imunológicas como macrófagos e linfócitos estão presentes no lúmen do compartimento intersticial de testículos dos peixes (URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2014). Macrófagos testiculares desempenham grande papel na manutenção do imunoprivilegio do testículo, conferindo proteção para o desenvolvimento dos espermatozóides, além de ser o principal apresentador de antígenos em um testículo normal e durante uma inflamação (BHUSHAN; MEINHARDT, 2017).

1.3 O sistema imunológico dos peixes

O sistema imunológico é um conjunto de mecanismos celulares e humorais responsável pela defesa do organismo contra vírus, bactérias, toxinas e células malignas (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). Ele está presente desde os invertebrados como insetos e

vertebrados inferiores como os peixes, sendo que os mamíferos são os modelos mais conhecidos e estudados (SUNYER, 2013). O sistema imunológico dos peixes é semelhante ao dos mamíferos em muitos aspectos, sendo dividido também em imunidade inata e imunidade adaptativa (URIBE et al., 2011). A imunidade inata geralmente antecede respostas adaptativas, ativando, determinando e cooperando na sua ação e na manutenção da homeostase do sistema (FEARON; LOCKSLEY, 1996). Barreiras epiteliais (pele e muco), moléculas do sistema complemento e células específicas (granulócitos, monócitos, macrófagos, e as células *Natural Killer* (NK)) compõem a imunidade inata nos peixes (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). A imunidade inata é capaz de reconhecer padrões moleculares presentes em patógenos como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos, DNA bacteriano, RNAs virais entre outras moléculas (MAGNADÓTTIR, 2006). Ao reconhecer alguns desses padrões, células como macrófagos e células NK são ativadas promovendo a fagocitose ou a morte do microrganismo invasor (LIESCHKE; TREDE, 2009).

Diferentemente da imunidade inata, a imunidade adaptativa é mediada por células específicas (LIESCHKE; TREDE, 2009) e seu mecanismo de ação ocorre por meio de uma rede de células especializadas, genes, proteínas e processos bioquímicos que fornecem as informações necessárias para que o organismo responda especificamente contra qualquer antígeno (URIBE et al., 2011). As células T exercem papel fundamental nas respostas adaptativas; todas elas possuem um receptor de células T (TCR) que reconhece um peptídeo apresentado por uma molécula do complexo de histocompatibilidade (MHC) em uma célula apresentadora de antígeno (APC) (NAKANISHI et al., 2002). Elas estão divididas em duas populações: as células T citotóxicas (CTL), que expressam o co-receptor CD8 e interagem com moléculas de MHC de classe I, e as células T *helper* (Th) que expressam o co-receptor CD4 e interagem com MHC de classe II (FISCHER et al., 2006). Dessa forma, as células T são capazes de reconhecer e destruir células infectadas por vírus e bactérias, além de células ou tecidos alogênicos (NAKANISHI; SHIBASAKI; MATSUURA, 2015).

1.4 Mecanismos de rejeição celular em peixes

A rejeição celular é um mecanismo da imunidade adaptativa mediado por células específicas, principalmente pelas células T, que reconhecem e destroem os antígenos derivados do doador (aloantígenos) (INGULLI, 2010). O reconhecimento ocorre pela interação das moléculas de MHC com os TCRs e, diferentemente dos humanos, os peixes possuem descritos genes clássicos e não clássicos de MHC classe I e MHC classe II (GRIMHOLT, 2016).

Entretanto, estas moléculas são reconhecidas respectivamente por células T CD8 e células T CD4 como ocorre nos mamíferos (NAKANISHI; SHIBASAKI; MATSUURA, 2015).

Os primeiros estudos com rejeição de transplantes em peixes foram realizados com peles e escamas (IWAMA; NAKANISHI, 1996). Macroscopicamente, os enxertos de escamas apresentaram perda da pigmentação e gradativamente foram recobertos até a formação de cicatrizes. Microscopicamente, a região começou a ser invadida por células imunológicas e no pico da citotoxicidade as células do enxerto foram gradualmente destruídas (HILDEMANN, 1958). Estudos posteriores detectaram a ocorrência de infiltrações de células T CD4 nas escamas transplantadas seguidas de células T CD8 e células B. Foi observado posteriormente que os macrófagos e granulócitos apareciam e agiam em conjunto com as células T para completar a rejeição alográfica (SHIBASAKI et al., 2010).

Como nos mamíferos, as células T CD4 ou T *helper* (Th) dos peixes podem se diferenciar em outras subpopulações (Th1, Th2, Th17 e Tregs), produzindo diferentes citocinas envolvidas na regulação de respostas imunológicas (NAKANISHI; SHIBASAKI; MATSUURA, 2015). Os mamíferos possuem apenas um tipo de CD4 que pode ser expresso também por outros tipos celulares além das células T, enquanto que em peixes foram encontrados duas formas de CD4 (CD4-1 e CD4-2) (LAING; HANSEN, 2011) e recentemente foi descoberto que macrófagos também podem expressar o CD4 (TAKIZAWA et al., 2016). Da mesma forma que nos mamíferos, as células T CD4 auxiliam nas respostas humorais e adaptativas, estimulando a produção de anticorpos pelas células B e desencadeando respostas citotóxicas mais eficientes (SOMAMOTO et al., 2014). Assim, nos processos de rejeição as células T CD4 atuam no reconhecimento de antígenos derivados do doador e expressam citocinas como IL-2 e IFN- γ , que induzem a diferenciação e a ação de outras células, tais como células T CD8 e macrófagos para destruir o tecido transplantado (INGULLI, 2010).

As células T CD8 ou células T citotóxicas (CTL) dos peixes também são similares aos dos mamíferos, sendo responsáveis por processos de citotoxicidade mediada por células antígeno-específicas (*antigen-specific cell-mediated cytotoxicity*) (TODA et al., 2009). Esse mecanismo elimina células infectadas por vírus e também atua na rejeição de tecidos transplantados (NAKANISHI et al., 2002). Células infectadas por vírus ou alogênicas são reconhecidas pela incompatibilidade do MHC classe I, sendo assim destruídas. No entanto, quando as células T CD8 são sensibilizadas previamente contra vírus ou transplantes entre clones, esses mecanismos citotóxicos não são ativados (SOMAMOTO et al., 2006).

Outro mecanismo que envolve as células T CD4 e CD8 é a reação hospedeiro versus enxerto (*Graft-versus-host-reaction GVHR*), um fenômeno que ocorre quando os enxertos

contêm células imunológicas do doador e o hospedeiro é incapaz de reconhecê-las ou as destrói (NAKANISHI; SHIBASAKI; MATSUURA, 2015). Se não forem eliminadas, as células do doador podem reagir contra antígenos do hospedeiro e o inverso da rejeição alográfica ocorre, num processo chamado de doença enxerto versus hospedeiro (*Graft-versus-host-disease GVHD*) que pode causar danos teciduais ou até levar a morte do hospedeiro (QIN et al., 2002). Células imunológicas derivadas dos doadores sensibilizadas contra antígenos do hospedeiro executam GVHR mais rapidamente em relação às células de doadores não sensibilizados, sugerindo uma espécie de memória imunológica, similar ao de mamíferos (SHIBASAKI et al., 2010). Esse mecanismo também está associado à velocidade de rejeição de transplantes (HILDEMAN, 1958), em que novos transplantes são rejeitados mais rapidamente.

1.5 Efeitos da ciclosporina e tacrolimus sobre o sistema imunológico

Os imunossuppressores são medicamentos que inibem ou destroem células do sistema imunológico (RATHEE, 2013). Utilizados inicialmente para evitar a rejeição e aumentar o sucesso dos transplantes, atualmente são utilizados também no tratamento de doenças autoimunes e alergias severas (HALLECK et al., 2013). Diversos agentes que atuam em diferentes mecanismos de proliferação ou ativação do sistema imunológico foram descobertos ao longo dos anos (WISEMAN, 2016). O primeiro agente imunossupressor foi a cortisona (corticosteroide), que demonstrou efeitos anti-inflamatórios no tratamento de artrite reumatoide (HENCH et al., 1949). Posteriormente, com a descoberta da ciclosporina, um peptídeo de origem fúngica, o sucesso dos transplantes renais e hepáticos aumentou significativamente (CALNE et al., 1979).

A ciclosporina e o tacrolimus (FK506) são imunossuppressores inibidores de calcineurina, uma proteína fosfatase de serina/treonina dependente de cálcio. Os imunossuppressores se ligam a imunofilinas citoplasmáticas (ciclofilina e FKBP) e bloqueiam a ação da calcineurina, na desfosforilação do fator de transcrição de células T ativadas (NFAT), impedindo sua migração para o núcleo (TEDESCO; HARAGSIM, 2012). Isso inibe a expressão principalmente da IL-2, citocina pró-inflamatória essencial para ativação e proliferação de células T (MACIAN, 2005).

Figura 1 – Mecanismo de ação da ciclosporina e tacrolimus na inibição da calcineurina.

Mechanism of action of cyclosporine or tacrolimus (FK506)

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2000 Cambridge University Press

Fonte (THOMSON; BONHAM; ZEEVI, 1995)

Legenda - A ciclosporina (CsA) e o tacrolimus (FK506) se ligam a duas imunofilinas citoplasmáticas, ciclofilina e FKBP, respectivamente. A formação dos complexos ciclosporina-ciclofilina ou tacrolimus-FKBP impedem a ação da calcineurina na defosforilação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e sua migração para o núcleo.

A ciclosporina circula associada a lipoproteínas, é metabolizada via citocromo P450, possui meia vida aproximada entre 6 e 24 horas e apresenta grande variação nas taxas de absorção (MYERS et al., 1984; HIGGINS et al., 2000). O tacrolimus é um farmacodinâmico similar à ciclosporina, possui absorção variável com média de 20 a 25% e uma meia-vida de eliminação em torno de dez horas (SPENCER; GOA; GILLIS, 1997). Dessa maneira, segundo informações prescritas, a ciclosporina é administrada uma vez ao dia, enquanto que o tacrolimus costuma ser dividido em duas vezes ao dia para transplantes de órgãos em humanos (GARCIA et al., 2004). Contudo, o tacrolimus possui efeitos mais potentes: ele se liga a receptores de glicocorticoides ou progesterona e mimetiza efeitos de corticoides, potencializando sua ação imunossupressora e impedindo a sua degradação (THOMSON; BONHAM; ZEEVI, 1995).

O uso de ciclosporina e do tacrolimus leva a efeitos colaterais como hipertensão arterial, diminuição fluxo sanguíneo nos rins e diabetes (KLEIN et al., 2002; BORDA et al., 2014). Efeitos mais severos incluem nefrotoxicidade aguda e crônica com significativa diminuição da filtração glomerular, principalmente com a administração de ciclosporina (WHITING et al., 1982). Este imunossupressor também estimula o sistema renina-angiotensina causando a fibrose do nefro e posteriormente a falência do rim (LEE, 1997). O uso de tacrolimus também pode causar nefrotoxicidade em menor escala, havendo melhoria das funções renais em pacientes que substituíram a ciclosporina pelo tacrolimus (PRATSCHKE et al., 1997). Assim, o tacrolimus é considerado um medicamento mais efetivo e com efeitos colaterais menos agressivos em relação à ciclosporina (GARCIA et al., 2004).

Os efeitos destes medicamentos em peixes são pouco conhecidos e restritos a algumas espécies. Em zebrafish, animais tratados com tacrolimus demonstraram regeneração anormal de nadadeiras caudais amputadas e anormalidades no crescimento natural de nadadeiras de peixes juvenis (KUJAWSKI et al., 2014). Segundo os autores, a imunossupressão não foi a causa da regeneração anormal, pois outros grupos tratados com outros imunossupressores não exibiram o mesmo resultado, indicando que o crescimento anormal é um alvo específico da ação do tacrolimus na inibição da calcineurina e não da imunossupressão em si. Outro estudo com a ciclosporina, também com zebrafish, mostrou que esta interfere na via de sinalização do NOTCH, causando má formação dos vasos sanguíneos em embriões. Contudo essa interferência também é um efeito da ligação da ciclosporina com a ciclofilina e não da inibição da via da calcineurina/NFAT (PANDEY et al., 2015).

2 Efeitos do tacrolimus e da ciclosporina sobre o sistema imunológico em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*

2.1 Introdução

O sistema imunológico é responsável por proteger o indivíduo contra diversas ameaças como vírus, parasitas e bactérias (LIESCHKE; TREDE, 2009). Os peixes, desde o estágio embrionário, são organismos que dependem da própria imunidade para sobreviver durante os primeiros dias de vida (ROMBOUT et al., 2005). O sistema imunológico dos peixes tem sido estudado há vários anos e grandes descobertas foram realizadas recentemente com o desenvolvimento de marcadores específicos (NAKANISHI; SHIBASAKI; MATSUURA, 2015). Diversas funções de células do sistema imunológico de peixes foram identificadas e descritas, muitas delas similares ao de mamíferos (SUNYER, 2013). Os peixes são capazes de desenvolver respostas imunológicas complexas da imunidade inata e adaptativa, tais como reconhecimento de padrões moleculares bacterianos e virais, produção de anticorpos, produção de citocinas e rejeição de transplantes (NAKANISHI; SHIBASAKI; MATSUURA, 2015).

A rejeição celular é um mecanismo da imunidade adaptativa em que o tecido ou órgão transplantado é reconhecido como corpo estranho e é destruído pelo sistema imunológico do organismo receptor, principalmente pelas células T (NAKANISHI et al., 2002). Quando ativadas pelo reconhecimento de antígenos derivados do doador, estas células sofrem uma expansão clonal, migram para o local do transplante e destroem o tecido transplantado (INGULLI, 2010). A rejeição celular é um dos principais obstáculos em transplantes de órgãos e, portanto, um dos motivos que levou o desenvolvimento de métodos para inibir o sistema imunológico em transplantes (HALLORAN, 2004).

A descoberta dos imunossupressores aumentou o sucesso dos transplantes e atualmente são utilizados também no tratamentos de alergias severas e doenças auto-imunes (HALLECK et al., 2013). Existem diversos imunossupressores com diferentes mecanismos de ação, que agem em diversas vias do sistema imunológico, atuando na redução de células ou em suas atividades (WISEMAN, 2016). Os inibidores de calcineurina, como a ciclosporina e o tacrolimus, inibem principalmente a produção de IL-2, uma citocina essencial para a ativação, proliferação e diferenciação de células T (SOGO et al., 2009). Diversos estudos sobre os efeitos e o uso de imunossupressores foram realizados em mamíferos, mas seus efeitos em peixes são pouco estudados e restritos a algumas espécies (KUJAWSKI et al., 2014; PANDEY et al., 2015). Com base nas considerações descritas, este trabalho buscou verificar os efeitos de dois

imunossupressores comumente utilizados em mamíferos, o tacrolimus e a ciclosporina, sobre o sistema imunológico de trutas arco-íris.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Manutenção dos animais

Os 100 espécimes de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* utilizados no presente estudo foram cedidos pela Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Campos de Jordão (UPD) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, localizada no Parque Estadual de Campos do Jordão. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados nesta mesma Unidade, seguindo os procedimentos do certificado CEUA-FMVZ-USP n° 1589150216, emitido em 2 de junho de 2016.

2.2.2 Efeitos dos imunossupressores *in vitro*

Células mononucleares do sangue periférico (PMC) foram cultivadas e tratadas com os imunossupressores para verificar inicialmente a ação *in vitro*. Duas trutas arco-íris foram anestesiadas em solução de benzocaína (proporção de 1:10000) e 2 ml de sangue foram coletados por punção diretamente da veia caudal de cada indivíduo. Em seguida o sangue foi diluído na proporção de 1:1 com meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Aproximadamente 4 ml do sangue diluído foram colocados sobre 3 ml de Ficoll-Paque Plus (densidade 1077) (GE Healthcare) e centrifugados a 700 x g por 30 minutos a 4°C. Células mononucleares foram recuperadas do botão leucocitário, transferidas para outro tubo e lavadas 3 vezes a 120 x g durante 10 minutos a 4°C com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,3% L-glutamina, 280mM de Hepes e 0,2% de NaHCO_3 (SIWICK, 1980).

As suspensões celulares foram preparadas numa concentração de 1×10^4 células viáveis/ml e 100 µl da suspensão celular (aproximadamente 100 a 200 células) foram cultivadas em placas de 96-wells e tratadas com ciclosporina (0,165 µg/µl), tacrolimus (0,05 µg/µl) e concanavalina A (0,05 µg/µl), conforme esquematizado na figura 2. As células foram cultivadas por 48 horas em estufa a 20 °C e contadas em câmara de Neubauer após 24 e 48 horas.

Figura 2 – Metodologia utilizada para experimento *in vitro*

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Metodologia utilizada para isolamento de leucócitos do sangue periférico de trutas arco-íris e cultivo com imunossupressores.

2.2.3 Administração *in vivo* de ciclosporina e tacrolimus

Foram testadas injeções intracelomáticas de emulsões contendo os imunossupressores (Fig 3). Foram preparadas emulsões contendo duas doses de ciclosporina 20 e 40 mg/kg e duas de tacrolimus 0,5 mg/kg e 1,5 mg/kg. Os imunossupressores foram dissolvidos em solução fisiológica 0,7% e misturadas com óleo (1:1) obtido a partir da gordura visceral de trutas arco-íris com 1% emulsificante ArlacelTM 165 (Croda). As emulsões foram levadas ao Vortex por 30 minutos até obter uma solução branca viscosa fluida. No total foram utilizados 100 animais divididos em 5 grupos contendo 20 animais (1 controle e 4 tratamentos). Cinco animais de cada grupo tiveram amostras de rim cefálico coletados 3, 7, 14 e 21 dias pós-injeção para confirmar se houve imunossupressão por quantificação de expressão de genes do sistema imunológico.

Figura 3 – Metodologias utilizadas para experimento *in vivo*

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Metodologia utilizada para injeção de imunossupressores em emulsão

2.2.4 Quantificação da expressão de genes do sistema imunológico para detecção de imunossupressão

Amostras do rim cefálico foram fixadas em solução de RNA *Later* (Invitrogen) por 12 horas e congeladas a -80°C para posterior processamento. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do Disruptor de células L-Beater 6 (Loccus) e o RNA total extraído com *TRIzol*TM *Reagent* (Invitrogen). As amostras de RNA foram quantificadas por Biodrop μLITE . 1 μg de RNA foi purificado com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) e a retrotranscrição foi realizada pelo *SuperScript III* (Invitrogen). Todos os procedimentos seguiram as instruções do fabricante. A quantificação da expressão gênica foi realizada utilizando o *Select SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) e *STEPOne Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems) pelo método de Curva Padrão com quatro diluições. Os *primers* específicos de genes ligados ao sistema imunológico e do controle endógeno estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – *Primers* com as respectivas sequências utilizados para qRT-PCR.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	No. de acesso no Genbank
<i>cd4</i>	Fw 5' - CGA GAG ACG ATA GAT CCA GAG TGG AAA G- 3' Rv 5' - TGT GAC TGA GGT ACT TGT TTG TGG CAT GA - 3'	100136451
<i>cd8</i>	Fw 5' - GGT TGT ACT CCT GTA TGC TCC AGA- 3' Rv 5' - AGA AGA ACT CCT GGC CTC CAC AAC - 3'	100136451
<i>il1b</i>	Fw 5' - GAC ATG GTG CGT TTC CTT TT - 3' Rv 5' - ACC GGT TTG GTG TAG TCC TG - 3'	100136024
<i>il2</i>	Fw 5' - CAT GTC CAG ATT CAG TCT TCT ATA CAC C - 3' Rv 5' - GAA GTG TCC GTT GTG CTG TTC TC - 3'	100302642
<i>il4</i>	Fw 5' - ACC ACC ACA AAG TGC AAG GAG TTC T - 3' Rv 5' - CAC CTG GTC TTG GCT CTT CAC AAC - 3'	100653462
<i>ifnγ</i>	Fw 5' - CCG TAC ACC GAT TGA GGA CT - 3' Rv 5' - GCG GCA TTA CTC CAT CCT AA - 3'	100136413
<i>actinb</i>	Fw 5' – GCA CTG GTT GTT GAC AAC GGA – 3' Rv 5' – AAC CAT CAC TCC CTG ATG CCT – 3'	100135845

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

2.2.5 – Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *Graphpad Prism* (Graphpad Software, USA) usando o teste de análise de variância (One-way ANOVA), seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações. A significância foi estabelecida para $p < 0,05$. Os resultados nos gráficos foram expressos pela média $\pm$ erro padrão.

2.3 Resultados

2.3.1 Efeitos do imunossupressores *in vitro*

Neste estudo, leucócitos isolados do sangue periférico de trutas arco-íris foram cultivados e tratados com ciclosporina e tacrolimus, com ou sem concanavalina. As células foram contadas 24 e 48 horas para verificar a inibição da proliferação/sobrevivência das células. Os grupos tratados com os imunossupressores apresentaram uma redução significativa no número de células em relação aos grupos não tratados nos dois períodos analisados (Fig. 4) ($p < 0,05$; One-way ANOVA). Os grupos tratados com os imunossupressores em conjunto com a concanavalina A, também demonstraram redução no número de células durante os dois períodos analisados.

Figura 4 – Histograma de sobrevivência dos leucócitos cultivados em presença dos imunossupressores e da concanavalina.

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Nota-se a baixa sobrevivência de leucócitos em cultura tratados com imunossupressores (n=5 repetições em cada grupo). Valores mostram a média $\pm$ erro padrão ($p < 0,05$; One-way ANOVA) do número de células presentes após 24 e 48 horas de cultivo. Controle sem tratamento (Ctr), Concanavalina A (ConA), Ciclosporina A (CsA), tacrolimus (FK).

2.3.2 Administração *in vivo* de ciclosporina e tacrolimus

A fim de se verificar a imunossupressão e o tempo de duração dos efeitos, foram aplicadas duas doses diferentes de cada imunossupressor uma única vez. Foram quantificadas as expressões de genes de citocinas do sistema imunológico e foi observado que não houve alterações nas respectivas expressões de *il1b* (Fig. 5A e 5B) e *il4a* (Fig. 5C e 5D) três ou sete dias após a injeção. Houve redução significativa da expressão de *il2* três dias após as injeções em todos os tratamentos em relação ao respectivo controle (Fig. 6A) ($p<0,05$; One-way ANOVA). Aos sete dias após as aplicações, a expressão de *il2* foi menor somente no grupo tratado com a maior dose de ciclosporina (Fig. 6B). No grupo tratado com a menor dose de tacrolimus foi obtido valores de *ifn γ* maiores que o controle (Fig. 6C e 6D) ($p<0,05$; One-way ANOVA).

Figura 5 – Expressões relativas de RNAm da *il1b* e *il4a* em rins de indivíduos tratados com ciclosporina e tacrolimus três e sete dias após as injeções.

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Expressão relativa da *il1b* e *il4a* três e sete dias após a administração dos imunossupressores. Não houve redução significativa da expressão destes genes. Valores mostram a média $\pm$ erro padrão ($n=4$ em cada grupo) ($p<0,05$, teste ANOVA) normalizados com o gene *actinb*.

Figura 6 – Expressões relativas de RNAm dos genes *il2* e *ifn γ* , em rins de indivíduos tratados com ciclosporina e tacrolimus três e sete dias após as injeções.

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Expressão relativa da *il2* e *ifn γ* três e sete dias após a administração dos imunossuppressores. (A) Houve redução significativa da expressão da *il2* três dias após as injeções. (B) Em sete dias houve apenas redução no tratamento de 40 mg/kg de ciclosporina. (C) Não houve redução significativa da expressão de *ifn γ* três dias após a injeção. (D) Sete dias após a injeção a dose de 0,5 mg/kg de tacrolimus estava mais alta que o controle. Valores mostram a média $\pm$ erro padrão (n=4 em cada grupo) ($p < 0,05$; One-way ANOVA) normalizados com o gene *actinb*.

A expressão de *il2* foi também analisada em amostras de 14 e 21 dias (Fig. 7), por apresentar valores inferiores ao do grupo controle em amostras de sete dias. No entanto, as análises não demonstraram diferenças nos níveis de *il2* entre os grupos tratados e o controle. Apesar da ausência de variação nos valores de expressão, aos 21 dias foi observado no grupo tratado com a menor dose de tacrolimus os menores valores médios de *il2*.

Figura 7 – Expressões relativas de RNAm dos genes *il2* em rins de indivíduos tratados com ciclosporina e tacrolimus 14 e 21 dias após as injeções.

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Expressão relativa da *il2* 14 e 21 dias após a administração dos imunossupressores. (A) Não houve redução significativa da expressão da *il2* 14 dias. (B) Não houve redução significativa dos tratamentos, a dose de 0,5 mg/kg de tacrolimus apresentou os valores médios mais baixos com apenas uma aplicação de imunossupressores. Valores mostram a média $\pm$ erro padrão (n=4 em cada grupo) ($p < 0,05$ One-way ANOVA) normalizados com o gene *actinb*.

2.4 Discussão

Neste estudo foi demonstrado que o tacrolimus e a ciclosporina, dois imunossupressores comumente utilizados em mamíferos, possuem efeitos inibitórios sobre a proliferação/sobrevivência de leucócitos *in vitro* e sobre a expressão de *il2* *in vivo* na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. A rejeição imunológica consiste num dos principais problemas decorrentes de transplantes de órgãos e tecidos. Porém, o advento dos imunossupressores e sua utilização neste tipo de procedimento cirúrgico aumentou significativamente a aceitação pelo organismo receptor, possibilitando a manutenção das funções do órgão transplantado e consequentemente prolongando a vida dos pacientes (WISEMAN, 2016). Os imunossupressores atuam em diferentes vias do sistema imunológico, impedindo por exemplo a produção de citocinas ou a proliferação celular do sistema imunológico (RATHEE, 2013). Muitos dos efeitos conhecidos são de testes realizados em mamíferos, sendo que os efeitos sobre o sistema imunológico dos peixes ainda são desconhecidos.

Os experimentos *in vitro* com leucócitos do sangue periférico de truta arco-íris demonstraram que tanto o tacrolimus como a ciclosporina foram capazes de inibir a proliferação ou sobrevivência destas, mesmo sob estímulo proliferativo, sugerindo que estas duas

substâncias possam atuar sobre o sistema imunológico da truta, assim como descrito para mamíferos. Em cultivo de células humanas, os dois medicamentos inibiram a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como *il2* e *ifn γ* , e impediram a proliferação de células T mesmo sob forte estímulo proliferativo (ANDERSSON et al., 1992). Eles também foram capazes de inibir a proliferação *in vitro* de células T regulatórias e indiretamente afetar respostas de anticorpos pelas células B (HEIDT et al., 2010; MIROUX et al., 2012).

Em seres humanos transplantados, ambos o tacrolimus e a ciclosporina são administrados em doses diárias (MYERS et al., 1984), devido provavelmente à meia vida curta destes medicamentos no organismo. No entanto, injeções diárias em peixes apresentaram baixíssima viabilidade em função do alto nível de estresse causado pela manipulação (POTTINGER; CARRICK, 1999). Com base nestas informações, a administração dos imunossupressores foi realizada utilizando emulsões como veículo, conforme utilizado para administração de hormônios (NORRIS; JONES, 1987; MAÑANOS, E., DUNCAN, N. & MYLONAS, 2008). No experimento *in vivo*, duas doses de tacrolimus (0,5 e 1,5 mg/kg) e de ciclosporina (20 e 40 mg/kg) foram administradas via emulsão em uma única aplicação. Em nenhum dos tratamentos foi observado casos de inflamação cutânea ou mortalidade durante o experimento.

Nas análises quantitativas, houve uma redução significativa somente na expressão de *il2* três dias após a aplicação em todos os grupos. Aos sete dias, apenas no tratamento com 40 mg/kg de ciclosporina a redução se manteve significativa. A ausência de diferenças significativas 14 e 21 dias após a injeção, mesmo para a dose maior de ciclosporina, sugerem que os imunossupressores em emulsão perderam seus efeitos. No caso das duas doses de tacrolimus e da dose mais baixa de ciclosporina, ambas as doses foram eficientes até os três dias enquanto que a eficácia da dose mais alta de ciclosporina se manteve até os sete dias. Em relação aos altos valores de *il2* no grupo controle aos três dias em relação aos dias sete e 14 podem ser decorrentes dos efeitos da injeção e/ou emulsão propriamente dita, uma vez que as emulsões são consideradas agentes adjuvantes que podem causar estimulação do sistema imunológico (MOREL et al., 2011).

Ao contrário do padrão observado para *il2*, as expressões da *ifn γ* , *il1b* e *il4a* não foram afetadas pelos imunossupressores. O tacrolimus e a ciclosporina inibiram principalmente a expressão de citocinas ligadas a via da calcineurina e do NFAT, por isso a expressão de *ifn γ* e *il1b* não foram provavelmente afetadas na truta arco-íris da mesma forma que nos mamíferos (ROSTAINING et al., 1999) A expressão de *il4* poderia ser afetada porque sua expressão também é ativada pelo NFAT como na *il2* e dependem do tipo de resposta imunológica (WANG;

SECOMBES, 2013). Além disso, os salmonídeos possuem quatro formas da *il4* (WANG et al., 2016), sendo que neste estudo foi avaliado apenas uma forma (*il4a*). É necessário avaliar as outras três isoformas a fim de elucidar se estas estão envolvidas com os mecanismos de resposta imunológica e se sofrem algum tipo de efeito de substâncias imunossupressoras.

2.5 Considerações

Neste estudo foi possível verificar que a ciclosporina e o tacrolimus são capazes de inibir a proliferação/sobrevivência *in vitro* de leucócitos do sangue periférico de trutas arco-íris. Nos experimentos *in vivo*, as duas doses de tacrolimus e a dose mais baixa da ciclosporina também conseguiram inibir significativamente a expressão de *il2* três dias após a aplicação da emulsão e por até sete dias com a maior dose de ciclosporina. Dentre os genes avaliados, a *il2* se mostrou um bom marcador para indicar a imunossupressão nos indivíduos tratados. Assim, o tacrolimus e a ciclosporina em emulsão podem ser utilizados para induzir a imunossupressão em estudos envolvendo transplantes, particularmente em transplantes de células germinativas e em enxertos de gônadas.

2.6 Referências bibliográficas

- ANDERSSON, J.; NAGY, S.; GROTH, C. G.; ANDERSSON, U. Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. **Immunology**, v. 75, n. 1, p. 136–42, 1992.
- HALLECK, F.; FRIEDERSDORFF, F.; FULLER, T. F.; MATZ, M.; HUBER, L.; DÜRR, M.; SCHÜTZ, M.; BUDDE, K. New perspectives of immunosuppression. **Transplantation Proceedings**, v. 45, n. 3, p. 1224–1231, abr. 2013.
- HALLORAN, P. F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 26, p. 2715–2729, 23 dez. 2004.
- HEIDT, S.; ROELEN, D. L.; EIJSINK, C.; EIKMANS, M.; VAN KOOTEN, C.; CLAAS, F. H. J.; MULDER, A. Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. **Clinical and experimental immunology**, v. 159, n. 2, p. 199–207, fev. 2010.
- INGULLI, E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. **Pediatric Nephrology**, v. 25, n. 1, p. 61–74, 2010.
- KUJAWSKI, S.; LIN, W.; KITTE, F.; BÖRMEL, M.; FUCHS, S.; ARULMOZHIVARMAN, G.; VOGT, S.; THEIL, D.; ZHANG, Y.; ANTOS, C. L. Calcineurin Regulates Coordinated Outgrowth of Zebrafish Regenerating Fins. **Developmental Cell**, v. 28, n. 5, p. 573–587, 2014.
- LIESCHKE, G. J.; TREDE, N. S. Fish immunology. **Current Biology**, v. 19, n. 16, p. R678–R682, ago. 2009.
- MAÑANOS, E., DUNCAN, N. & MYLONAS, C. C. (2008). Reproduction and control of ovulation, spermatogenesis and spawning in cultured fish. IN CABRITA, E., ROBLES, V. &

- HERRÁEZ, M. P. (Eds.). **Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species.**, p. 1–66, 2008.
- MIROUX, C.; MORALES, O.; GHAZAL, K.; OTHMAN, S. Ben; DE LAUNOIT, Y.; PANCRÉ, V.; CONTI, F.; DELHEM, N. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. **Transplantation**, v. 94, n. 2, p. 123–31, 27 jul. 2012.
- MOREL, S.; DIDIERLAURENT, A.; BOURGUIGNON, P.; DELHAYE, S.; BARAS, B.; JACOB, V.; PLANTY, C.; ELOUAHABI, A.; HARVENGT, P.; CARLSEN, H.; KIELLAND, A.; CHOMEZ, P.; GARÇON, N.; VAN MECHELEN, M. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. **Vaccine**, v. 29, n. 13, p. 2461–2473, 16 mar. 2011.
- MYERS, B. D.; ROSS, J.; NEWTON, L.; LUETSCHER, J.; PERLROTH, M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 11, p. 699–705, 13 set. 1984.
- NAKANISHI, T.; FISCHER, U.; DIJKSTRA, J. M.; HASEGAWA, S.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; OTOTAKE, M. Cytotoxic T cell function in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n. 2, p. 131–139, 2002.
- NAKANISHI, T.; SHIBASAKI, Y.; MATSUURA, Y. T Cells in Fish. **Biology**, v. 4, n. 4, p. 640–663, 2015.
- NORRIS, D. O.; JONES, R. E. **Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles**. Boston, MA: Springer US, 1987.
- PANDEY, R.; BOTROS, M. A.; NACEV, B. A.; ALBIG, A. R. Cyclosporin a disrupts notch signaling and vascular lumen maintenance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.
- POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. **General and Comparative Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 122–132, 1999.
- RATHEE, P. et al. Immunosuppressants : A Review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 1, p. 1–12, 2013.
- ROMBOUT, J.; HUTTENHUIS, H.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 5, p. 441–455, nov. 2005.
- ROSTAING, L.; PUYOO, O.; TKACZUK, J.; PERES, C.; ROUZAUD, A.; CISTERNE, J. M.; DE PREVAL, C.; OHAYON, E.; DURAND, D.; ABBAL, M. Differences in Type 1 and Type 2 intracytoplasmic cytokines, detected by flow cytometry, according to immunosuppression (cyclosporine A vs. tacrolimus) in stable renal allograft recipients. **Clinical Transplantation**, v. 13, n. 5, p. 400–409, 1999.
- SOGO, T.; KAWAHARA, M.; UEDA, H.; OTSU, M.; ONODERA, M.; NAKAUCHI, H.; NAGAMUNE, T. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. **Cytokine**, v. 46, n. 1, p. 127–136, 2009.
- SUNYER, J. O. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. **Nature Immunology**, v. 14, n. 4, p. 320–326, 19 mar. 2013.
- WANG, T.; JOHANSSON, P.; ABÓS, B.; HOLT, A.; TAFALLA, C.; JIANG, Y.; WANG, A.; XU, Q.; QI, Z.; HUANG, W.; COSTA, M. M.; DIAZ-ROSALES, P.; HOLLAND, J. W.; SECOMBES, C. J. First in-depth analysis of the novel Th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities. **Oncotarget**, v. 7, n. 10, p. 10917–10946, 2016.
- WANG, T.; SECOMBES, C. J. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1703–1718, 2013.
- WISEMAN, A. C. Immunosuppressive Medications. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 332–343, 5 fev. 2016.

3 Efeitos da administração de tacrolimus em enxertos de testículo em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*

3.1 Introdução

O transplante de células germinativas permite reproduzir uma espécie utilizando outra como “barriga de aluguel” (TAKEUCHI; YOSHIKAWA; TAKEUCHI, 2004). Por meio dessa técnica é possível produzir gametas alógenos e xenógenos derivados de células germinativas de uma espécie transplantando-as em uma espécie hospedeira diferente (TAJIMA et al., 1993; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994). Ela pode ser aplicada na conservação de espécies ameaçadas de extinção ou na produção de espécies comerciais (MAJHI et al., 2009; MAJHI; KUMAR, 2017). Em peixes, foi demonstrada pela primeira vez em salmonídeos e reproduzida com sucesso em diversas outras espécies com a produção de gametas e animais viáveis (MAJHI et al., 2009; MORITA et al., 2012; FARLORA et al., 2014; SILVA et al., 2016; HAMASAKI et al., 2017; SEKI et al., 2017).

Outra forma de transplantes consiste nos enxertos de tecido testicular na região subcutânea ou diretamente no testículo de algum indivíduo (VAN SAEN et al., 2009; BHATTA et al., 2012). Enxertos de testículo alogênicos ainda são incipientes devido ao sistema imunológico do hospedeiro que rejeita os fragmentos de testículo enxertados. Estes mesmos mecanismos podem estar envolvidos também na baixa eficiência de transplantes de células germinativas em peixes. Embora, as taxas de colonização sejam altas, o número de hospedeiros capazes de produzir espermatozóides ou ovócitos dos doadores após a maturação sexual é inferior a 30% (OKUTSU et al., 2006; MAJHI et al., 2009; MORITA et al., 2012; FARLORA et al., 2014). Assim, utilizar imunossupressores pode ser uma alternativa de aumentar a eficiência dos transplantes de células germinativas ou permitir enxertos alogênicos de testículo, através da inibição do sistema imunológico.

A imunossupressão do hospedeiro é uma prática muito utilizada nos transplantes de órgãos em humanos. Os imunossupressores bloqueiam a ativação do sistema imunológico e impedem a rejeição do órgão transplantado (RATHEE, 2013). Mamíferos e peixes possuem um sistema imunológico muito semelhante e compartilham mecanismos como a rejeição celular (NAKANISHI; SHIBASAKI; MATSUURA, 2015). Com base nas considerações descritas este trabalho buscou avaliar a utilização de tacrolimus em transplantes alogênicos subcutâneos de tecido testicular em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Manutenção dos animais

Os 60 espécimes de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* utilizados no presente estudo foram cedidos pela Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Campos de Jordão (UPD) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, localizada no Parque Estadual de Campos do Jordão. Os enxertos de testículo foram realizados nesta mesma Unidade, seguindo os procedimentos do certificado CEUA-FMVZ-USP n° 1589150216, emitido em 2 de junho de 2016.

3.2.2 Preparo do imunossupressor tacrolimus em emulsões

As emulsões foram preparadas com óleo (1:1), obtido a partir da gordura visceral de trutas arco-íris com 1% e emulsificante ArlacelTM 165 (Croda). O imunossupressor tacrolimus, selecionado com base nos resultados do artigo 1 deste trabalho e com base nos baixos índices de efeitos colaterais descritos pela literatura, foi dissolvido em solução fisiológica 0,7% e diluído em solução emulsificante para preparação de duas concentrações (0,5 mg/ml e 1,5 mg/ml). As emulsões foram homogenizadas por 30 minutos até obter uma solução branca e viscosa.

3.2.3 Enxertos alôgenicos de testículo em trutas arco-íris

Quinze trutas da linhagem Jordanense com aproximadamente seis meses de idade foram utilizadas como doadores. Os animais foram submetidos à anestesia com benzocaína na proporção de 1:10000 e colocados em posição de decúbito com o auxílio de um suporte. Uma incisão craniocaudal na região ventral do animal foi feita para remoção do lobo esquerdo do testículo. O testículo coletado foi cortado em oito fragmentos de aproximadamente 5 mm de espessura e em seguida dois fragmentos foram enxertados em cada lado da região dorsal, a 2 cm da nadadeira dorsal do próprio animal (controle doador) e também de outras três trutas de 1 ano de idade (Fig. 8). O mesmo procedimento foi repetido em outros 14 grupos.

Figura 8 – Esquema da metodologia utilizada para enxerto subcutâneo de tecido testicular

Coleta do lobo esquerdo do testículo

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Metodologia utilizada para enxerto subcutâneo de testículo baseado em (BHATTA et al., 2012)

Os animais enxertados foram divididos em três grupos de 20 animais (Quadro 2), sendo que dois grupos foram administrados com a dose alta e a baixa de tacrolimus preparadas previamente e um terceiro grupo administrado apenas com a emulsão (sem imunossupressor; controle negativo). As emulsões foram aplicadas semanalmente, sendo que a primeira dose foi administrada no mesmo dia do enxerto. Cinco animais de cada grupo tiveram amostras de rim cefálico e da região dos enxertos coletadas na primeira, terceira e quinta semana pós-enxerto para análises de expressão de RNAm e histologia convencional, a fim de avaliar os efeitos sobre a expressão de *il2* e a integridade do testículo enxertado, respectivamente.

Quadro 2 – Grupos formados para tratamento com imunossupressores dos exemplares enxertados.

Tempo (semana)	Grupo Experimental (n)			
	Doador	Controle negativo (veículo)	tacrolimus	
			0,5 mg/Kg	1,5 mg/Kg
1	5	5	5	5
3	5	5	5	5
5	5	5	5	5

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

3.2.4 Análise histológica dos enxertos de testículo

Amostras da região dos enxertos foram fixadas em solução de Bouin's por 24 horas e mantidas em etanol 70% até o processamento. Os enxertos foram desidratados em gradiente crescente de etanol por uma hora e meia cada (etanol, 70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em duas etapas de uma hora e meia de xilol e finalmente incluídos em paraplast (Sigma). As amostras foram cortadas em micrótomo com espessura de 5µm e aderidos em lâminas para microscopia. Em seguida cortes foram desparafinizados durante 30 minutos em estufa a 60 °C, 15 minutos em banho de xilol e 10 minutos em solução de etanol 100% com xilol (1:1), seguidos de hidratação em gradiente decrescente de etanol por 10 minutos em etanol 100%, 7 minutos em etanol 90%, 5 minutos em etanol 70% e 5 minutos em água corrente. Em seguida, as lâminas foram coradas com Hematoxilina por 1 minuto, lavadas em água corrente durante 5 minutos e coradas com Eosina por 2 minutos, seguido de um banho de água destilada. As lâminas foram então desidratadas por 2 minutos em etanol 70%, 2 minutos em etanol 90%, 2 minutos em etanol 100%, 2 minutos em solução de etanol 100%/xilol (1:1) e dois banhos de xilol por 2 minutos para posterior montagem das lâminas.

3.2.5 Quantificação da expressão dos genes *il2*, *vasa* e *txdnc6*

Amostras do rim cefálico e dos enxertos foram fixadas em solução de RNA *Later* (Invitrogen) por 12 horas e congeladas a -80°C para posterior processamento. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do Disruptor de células L-Beater 6 (Loccus) e o RNA total extraído com *TRIzolTM Reagent* (Invitrogen). As amostras de RNA foram quantificadas por Biodrop μLITE . 1 μg de RNA foi purificado com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) e a retrotranscrição foi realizada pelo *SuperScript III* (Invitrogen). Todos os procedimentos seguiram as instruções do fabricante. A quantificação da expressão gênica foi realizada utilizando *EVAGreen Master Mix* (Solis Biodyne) e *STEPOne Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems) pelo método de Curva Padrão com quatro diluições. Os *primers* específicos de genes ligados ao sistema imunológico e do controle endógeno estão apresentados no quadro 3.

As reações de RT-PCR foram realizadas a partir do cDNA das amostras sintetizadas previamente. As reações foram realizadas com o *EmeraldAmp GTPCR Master Mix* (Takara Bio Inc, Shiga, Japão) usando 1 μl de cDNA como *template*. As condições de amplificação foram as seguintes: 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, e 72°C por 90 s para os genes *vasa*, *txdnc6* e *actinb*. As sequências dos *primers* estão apresentadas no quadro 3.

Quadro 3 – Sequência dos *primers* utilizados para qRT-PCR e RT-PCR semi quantitativo

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	No. de acesso no Genbank
<i>il2</i>	Fw 5'- CAT GTC CAG ATT CAG TCT TCT ATA CAC C - 3' Rv 5'- GAA GTG TCC GTT GTG CTG TTC TC - 3'	100302642
<i>vasa</i>	Fw 5'- GTT ACC ACA AGT AAT GAA AGT GGA TTG AGC TCG TG- 3' Rv 5'- ACC ACC ATC CAT GTT TGA GCC TT- 3'	AB032566
<i>txdnc6</i>	Fw 5'- AGC AAA GAA AAC GCT ATC GCA GAA- 3' Rv 5'- CAT GGC GTG CTG GAC ATT GG - 3'	FP320679
<i>actinb</i>	Fw 5' – GCA CTG GTT GTT GAC AAC GGA – 3' Rv 5' – AAC CAT CAC TCC CTG ATG CCT – 3'	100135845

3.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *Graphpad Prism* (Graphpad Software, USA) para o teste de análise de variância (One-way ANOVA), seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, com significância adotando $p < 0,05$. Os resultados nos gráficos foram expressos pela média $\pm$ erro padrão.

3.3 Resultados

3.3.1 Análises histológicas dos enxertos

A região onde foi realizado o enxerto estava localizada no interior da musculatura, sendo detectado em vários indivíduos fragmentos do enxerto em diversos graus de degradação/absorção com intensa vascularização. Em várias seções, foi possível identificar a presença de linfócitos (setas amarelas nas figuras a seguir). Na primeira semana pós-enxerto, a presença de células germinativas pôde ser constatada apenas no grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus, com espermatogônias isoladas e lóbulos contendo espermatozóides (Fig. 9E e 9F). Nos demais grupos (Fig. 9A a 9D; Fig. 9G e 9H), apesar da presença de estruturas que se assemelhavam aos lóbulos testiculares, não foram detectadas no interior células germinativas.

Figura 9 – Microfotografias da região enxertada na primeira semana pós-enxerto.

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Microfotografias dos enxertos de testículo na primeira semana. (A-B) Panorama geral da região enxertada e o aumento da região destacada no grupo de doadores, sem a presença de células germinativas. (C-D)

Vista geral da região do enxerto no controle negativo (veículo) e o aumento da região destacada mostrando linfócitos, sem nenhuma célula germinativa. (E-F) Vista geral da região do enxerto no grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus e o aumento da região destacada, com células germinativas. (G-H) Vista geral da região do enxerto no grupo tratado com 1,5 mg/kg de tacrolimus e aumento da região destacada, sem células germinativas. Imagens inferiores representam as regiões destacadas nas imagens superiores. Setas amarelas e pretas indicam linfócitos e células germinativas, respectivamente. Barras nas imagens superiores representam 200 μ m e nas inferiores 50 μ m.

Nos exemplares coletados na terceira semana pós-enxerto, foram visualizadas células germinativas apenas no grupo dos doadores (Fig. 10A e 10B). No controle negativo (Fig. 10C e 10D) e nos dois grupos tratados com tacrolimus (Fig. 10E-H), os enxertos ainda continham várias células em necrose, com a presença de linfócitos. Em nenhum destes grupos foi detectado a presença de células germinativas.

Figura 10 – Microfotografias da região enxertada na terceira semana pós-enxerto.

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Microfotografias dos enxertos de testículo na terceira semana. (A-B) Panorama geral da região enxertada e o aumento da região no grupo dos doadores, com a presença de uma célula germinativa. (C-D) Panorama geral da região enxertada no controle negativo (veículo) e o aumento da região destacada mostrando linfócitos, sem nenhuma célula germinativa. (E-F) Vista geral da região do enxerto no grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus e o aumento da região destacada mostrando linfócitos, sem células germinativa. (G-H) Vista geral da região do enxerto no grupo tratado com 1,5 mg/kg de tacrolimus e o aumento da região destacada sem células germinativas. Imagens inferiores representam as regiões destacadas nas imagens superiores. Setas amarelas e pretas indicam linfócitos e células germinativas, respectivamente. Barras nas imagens superiores representam 200 μ m e nas inferiores 50 μ m

Nos exemplares coletados na quinta semana pós-enxerto, a presença de células germinativas foi detectada apenas no grupo dos doadores (Fig. 11A-11B). Nos exemplares do grupo do controle negativo (Fig. 11C-11D) e nos dois grupos tratados com tacrolimus (Fig. 11E-H) não foram observadas nenhuma célula germinativa.

Figura 11 – Microfotografias da região enxertada na quinta semana pós-enxerto

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Microfotografias dos enxertos de testículo na quinta semana. (A-B) Panorama geral da região enxertada e o aumento destacada no grupo dos doadores, com células germinativa. (C-D) Panorama geral da região enxertada no controle negativo (veículo) e o aumento da região destacada mostrando linfócitos, sem nenhuma célula germinativa. (E-F) Vista geral da região do enxerto no grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus e o aumento da região destacada mostrando linfócitos, sem células germinativa (G-H) Vista geral da região do enxerto no grupo tratado com 1,5 mg/kg de tacrolimus e o aumento da região destacada sem células germinativas. Imagens inferiores representam as regiões destacadas nas imagens superiores. Setas amarelas e pretas indicam linfócitos e células germinativas, respectivamente. Barras nas imagens superiores representam 200 μ m e nas inferiores 50 μ m

3.3.2 Análises de RT-PCR expressão de RNAm

As análises de RT-PCR para os genes *vasa* e *txdnc6* indicaram a presença de células germinativas indiferenciadas e espermátides nos doadores na primeira e terceira semana pós-enxerto (Fig. 12A), Houve amplificação destes mesmos genes no grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus (Fig. 12C). A presença de células germinativas indiferenciadas foi indicada na primeira semana e espermátides na primeira, terceira e quinta semana pós-enxerto. No entanto,

não foram detectados nenhum destes marcadores no grupo tratado com 1,5 mg/kg de tacrolimus (Fig. 12B) e no controle negativo (veículo) (Fig.12D) em nenhum dos períodos analisados.

Figura 12 – Análise de RT-PCR dos genes *vasa*, *txdnc6* e *actinb* nos enxertos.

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – RT-PCR dos exemplares enxertados para *vasa*, *txdnc6* e *actinb* (controle endógeno). (A) No grupo dos doadores foi possível observar amplificação do gene *vasa* em três indivíduos (1,3 e 6) e do *txdnc6* em dois indivíduos (1 e 4). (B) No controle negativo (veículo) não foi observada nenhuma amplificação destes mesmos genes. (C) No grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus foi possível observar amplificação de *vasa* em dois indivíduos na primeira semana (2 e 3) e *txdnc6* em um indivíduo na primeira (2), um na terceira (5) e dois na quinta semana (7 e 9). (D) No grupo tratado com 1,5 mg/kg de tacrolimus não foi observada nenhuma amplificação destes genes em nenhum dos três períodos. O gene *actinb* foi utilizado como controle endógeno das amostras.

Análises de expressão de RNAm da *il2* no rim cefálico dos exemplares enxertados demonstram que não houve alterações durante a primeira semana pós-enxerto, apesar dos valores médios no controle negativo estarem mais altos que nos grupos tratados com imunossupressor (Fig.13A). Houve um aparente aumento na expressão da *il2* no grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus na terceira semana pós-enxerto, embora não significativo em relação aos demais grupos (Fig.13B). Na quinta semana pós-enxerto, a expressão da *il2* no controle negativo sofreu um aparente aumento, enquanto que nos grupos tratados com tacrolimus, os valores das expressões estavam aparentemente mais baixos (Fig13C).

Figura 13 – Expressões relativas de RNAm da *il2* no rim cefálico de exemplares enxertados e tratados com tacrolimus

Fonte: YOSHINAGA, T. T, 2018

Legenda – Expressão da *il2* nos exemplares tratados com emulsões de tacrolimus ao longo de 5 semanas de tratamento. (A) Não houve alterações na expressão da *il2* na primeira semana de tratamento. (B) Houve um aparente aumento da expressão no grupo tratado com 0,5 mg/kg de tacrolimus na terceira semana, sem diferença significativa em relação aos demais grupos. (C) A expressão de *il2* nos grupos tratados com tacrolimus estava aparentemente mais baixa que no controle negativo, porém sem diferenças significativas. Valores representam a média $\pm$ erro padrão (n=5 em cada grupo) ($p < 0,05$; One-way ANOVA). Todas as amostras foram normalizadas com o gene *actinb*.

3.4 Discussão

Neste estudo, a utilização do imunossupressor tacrolimus se mostrou eficiente na imunossupressão dos receptores, evitando ou retardando a rejeição de células germinativas em enxertos de testículo subcutâneo na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Juntamente com os transplantes de células germinativas, os enxertos de testículo são técnicas reprodutivas com ampla aplicação, desde estudos de espermatogênese e de desenvolvimento de testículo até reprodução de espécies comerciais ou ameaçadas de extinção (RODRIGUEZ-SOSA; TANG; DOBRINSKI, 2013). A produção de gametas alogênicos ou xenogênicos por meio destas técnicas já foi realizada com sucesso em diversas espécies de peixes (LACERDA et al., 2013; ARREGUI; DOBRINSKI, 2014). Porém, em ambos os métodos, a rejeição pelo sistema imunológico do hospedeiro pode estar relacionada com os baixos índices de eficiência, assim como nos transplantes de órgãos e humanos (HALLORAN, 2004).

Nos enxertos realizados foi possível visualizar células germinativas por análises histológicas nos doadores até a quinta semana pós-enxerto. Ao analisar os enxertos alogênicos, apenas no tratamento de 0,5 mg/kg de tacrolimus foi possível observar células germinativas na

primeira semana pós-enxerto, não sendo detectado nenhuma célula germinativa testicular após a terceira semana. No grupo tratado com 1,5 mg/kg de tacrolimus e no grupo sem imunossupressor também não foram visualizadas nenhuma célula germinativa ou estrutura típica de testículo durante o período analisado. Enxertos subcutâneos de testículo são capazes de retomar a espermatogênese e produzir espermatozóides totalmente viáveis para reprodução, conforme demonstrado em tilápia-do-Nilo e mais recentemente em trutas arco-íris (BHATTA et al., 2012; HAYASHI; SAKUMA; YOSHIZAKI, 2018). Neste último estudo, os enxertos alogênicos de testículo foram rejeitados a partir da sexta semana pós-enxerto com significativa redução de fragmentos testiculares até a completa rejeição na nona semana.

Enxertos podem ser tolerados por mais tempo dependendo do período reprodutivo, já que hormônios como os esteroides sexuais, o cortisol, hormônio de crescimento e a prolactina influenciam diretamente nas funções do sistema imunológico (HARRIS; BIRD, 2000). A testosterona por exemplo pode afetar a sobrevivência dos leucócitos *in vitro*, atuando como substância imunoregulatória (SLATER; SCHRECK, 1997). Durante a época reprodutiva, os salmonídeos produzem altos níveis de hormônios esteroides, como o estradiol e androstenediona, sendo que ambos os sexos apresentam imunodeficiências durante este período (MAULE et al., 1996; HARRIS; BIRD, 2000). Dessa maneira, enxertos realizados em períodos que antecedem a época reprodutiva podem ser tolerados por mais tempo devido ao aumento gradual dos hormônios esteroides, que por sua vez inibem o sistema imunológico. Isso pode explicar casos de auto-enxertos que não persistem por longos períodos ou a ausência de células germinativas e alguns indivíduos do grupo dos doadores neste trabalho.

Outro fator que pode aumentar a tolerância nos enxertos é o grau de parentesco entre os indivíduos. O sucesso dos transplantes em humanos é influenciado diretamente pelo grau de compatibilidade entre o *human leukocyte antigen* (HLA) do doador e do receptor; quanto maior a incompatibilidade, maior a chance de rejeição dos transplantes, com a possibilidade do surgimento da doença-enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) e em casos extremos até a morte do paciente (PETERSDORF, 2004). Em peixes, a compatibilidade entre os *loci* do complexo de histocompatibilidade (MHC) entre o doador e receptor também podem afetar a velocidade da rejeição celular. Rejeição a enxertos alogênicos de escamas em *Gila topminnow* (*Poeciliopsis o. occidentalis*) foi 70% mais lenta quando havia compatibilidade nos *loci* de MHC (CARDWELL; SHEFFER; HEDRICK, 2001). Assim, dependendo da distância genética entre o doador e receptor os enxertos podem ou não ser tolerados por mais tempo.

Apesar das células germinativas terem sido visualizadas pelas análises histológicas apenas na primeira semana, a expressão de *vasa* e *txdnc6* indicaram a presença de células

germinativas e espermatídes nos exemplares tratados com 0,5 mg/kg de tacrolimus na primeira, terceira e quinta semana. Estes mesmos marcadores foram detectados nos auto-enxertos na primeira e terceira semana, sendo corroborados pelos resultados das análises histológicas. Não houve detecção dos mesmos marcadores no grupo tratado com 1,5 mg/kg de tacrolimus e no grupo controle sem imunossupressor. O *vasa* é um marcador de células germinativas, principalmente das indiferenciadas, enquanto que o *txdnc6* é expresso principalmente em células como espermatócitos e espermatídes, geralmente encontradas nas fases finais da espermatogênese (YOSHIZAKI et al., 2000; ROLLAND et al., 2009). A presença do *vasa* e do *txdnc6* nos enxertos do grupo tratado com a menor dose de tacrolimus e os baixos níveis de expressão de *il2* sugerem que esta droga teve efeito imunossupressor, permitindo a manutenção de células germinativas. Técnicas de imunohistoquímica com sondas de RNAm (hibridação *in situ*) ou anticorpos desses genes poderão facilitar a detecção das células germinativas nos enxertos. Em relação ao grupo tratado com a maior dose de tacrolimus, é possível que concentrações mais altas deste imunossupressor afetem a eficácia da ação imunossupressora.

A expressão de *il2* no rim cefálico dos exemplares tratados com 0,5 mg/kg aparentemente se manteve baixa enquanto que no controle negativo houve um aparente aumento ao longo do tempo. A *il2* é uma citocina essencial para a ativação e proliferação de células T (SOGO et al., 2009), as principais efetoras da rejeição celular (NAKANISHI et al., 2002). Dados obtidos previamente (artigo 1) demonstraram que uma dose de 0,5 mg/kg de Tacrolimus em emulsão inibe significativamente a expressão de *il2* por até três dias enquanto que uma dose alta de ciclosporina (40 mg/Kg) pode manter a expressão baixa por até uma semana. Em enxertos de pele, o início da rejeição é marcada por uma grande infiltração de células T. Posteriormente os macrófagos e neutrófilos chegam para completar o processo de rejeição (SHIBASAKI et al., 2010). Apesar de células imunológicas terem sido detectadas através das análises histológicas, células germinativas puderam ser detectadas por RT-PCR no grupo com a dose baixa de imunossupressor, sugerindo que a imunossupressão por tacrolimus foi capaz de “burlar” temporariamente o sistema imunológico do hospedeiro e consequentemente estender a permanência do testículo enxertado.

3.5 Considerações

Neste estudo demonstramos que o tacrolimus pode ser utilizado para imunossuprimir recipientes e evitar a rejeição celular em enxertos de testículo. A dose de 0,5 mg/kg administrada via emulsão conseguiu aparentemente manter uma baixa expressão de *il2*, gene associado à resposta imunológica, e permitiu que células germinativas diferenciadas (espermátides e espermatócitos) se mantivessem por até cinco semanas nos enxertos alogênicos. Terapias com imunossupressores em transplantes de órgãos em humanos geralmente utilizam dois ou mais medicamentos para inibir duas ou mais vias de ativação do sistema imunológico. Dessa maneira, a utilização de outros imunossupressores como a rapamicina juntamente com o tacrolimus pode ser uma alternativa para otimizar a imunossupressão e consequentemente permitir a manutenção dos enxertos nos receptores por períodos mais longos.

3.6 Referências bibliográficas

- ARREGUI, L.; DOBRINSKI, I. Xenografting of testicular tissue pieces: twelve years of an in vivo spermatogenesis system. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 148, n. 5, p. R71, 2014.
- BHATTA, S.; IWAI, T.; MIURA, C.; HIGUCHI, M.; SHIMIZU-YAMAGUCHI, S.; FUKADA, H.; MIURA, T. Gonads directly regulate growth in teleosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11408–11412, 10 jul. 2012.
- BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 24, p. 11298–11302, 22 nov. 1994.
- CARDWELL, T. N.; SHEFFER, R. J.; HEDRICK, P. W. MHC variation and tissue transplantation in fish. **The Journal of heredity**, v. 92, n. 4, p. 305–8, 2001.
- FARLORA, R.; HATTORI-IHARA, S.; TAKEUCHI, Y.; HAYASHI, M.; OCTAVERA, A.; ALIMUDDIN; YOSHIZAKI, G. Intraperitoneal Germ Cell Transplantation in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 309–320, 6 jun. 2014.
- HALLORAN, P. F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 26, p. 2715–2729, 23 dez. 2004.
- HAMASAKI, M.; TAKEUCHI, Y.; YAZAWA, R.; YOSHIKAWA, S.; KADOMURA, K.; YAMADA, T.; MIYAKI, K.; KIKUCHI, K.; YOSHIZAKI, G. Production of Tiger Puffer *Takifugu rubripes* Offspring from Triploid Grass Puffer *Takifugu niphobles* Parents. **Marine Biotechnology**, p. 1–13, 23 set. 2017.
- HARRIS, J.; BIRD, D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 77, p. 163–176, 2000.
- HAYASHI, M.; SAKUMA, D.; YOSHIZAKI, G. Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. **Molecular Reproduction and Development**, 15 jan. 2018.
- LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y.; MORITA, T.; YOSHIZAKI, G.; FRANÇA, L. R. Germ

- cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 3–11, 2013.
- MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; YOKOTA, M.; WATANABE, S.; STRÜSSMANN, C. A. Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germlines. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6132, 2 jul. 2009.
- MAJHI, S. K.; KUMAR, S. Germ Cell Transplantation: A Potential Tool for Propagation of Endangered Fishes. **Annals of Aquaculture and Research**, 2017.
- MAULE, A. G.; SCHROCK, R.; SLATER, C.; FITZPATRICK, M. S.; SCHRECK, C. B. Immune and endocrine responses of adult chinook salmon during freshwater immigration and sexual maturation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 6, n. 3, p. 221–233, 1996.
- MORITA, T.; KUMAKURA, N.; MORISHIMA, K.; MITSUBOSHI, T.; ISHIDA, M.; HARA, T.; KUDO, S.; MIWA, M.; IHARA, S.; HIGUCHI, K.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of Donor-Derived Offspring by Allogeneic Transplantation of Spermatogonia in the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 6, p. 1–11, 2012.
- NAKANISHI, T.; FISCHER, U.; DIJKSTRA, J. M.; HASEGAWA, S.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; OTOTAKE, M. Cytotoxic T cell function in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n. 2, p. 131–139, 2002.
- NAKANISHI, T.; SHIBASAKI, Y.; MATSUURA, Y. T Cells in Fish. **Biology**, v. 4, n. 4, p. 640–663, 2015.
- OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2725–2729, 21 fev. 2006.
- PETERSDORF, E. W. Hla matching in allogeneic stem cell transplantation. **Current Opinion in Hematology**, v. 11, n. 6, p. 386–391, 1 nov. 2004.
- RATHEE, P. et al. Immunosuppressants : A Review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 1, p. 1–12, 2013.
- RODRIGUEZ-SOSA, J. R.; TANG, L.; DOBRINSKI, I. Testicular Tissue Grafting and Male Germ Cell Transplantation. In: [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 489–500.
- ROLLAND, A. D.; LAREYRE, J. J.; GOUPIL, A. S.; MONTFORT, J.; RICORDEL, M. J.; ESQUERRÉ, D.; HUGOT, K.; HOULGATTE, R.; CHALMEL, F.; LE GAC, F. Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1–22, 2009.
- SEKI, S.; KUSANO, K.; LEE, S.; IWASAKI, Y.; YAGISAWA, M.; ISHIDA, M.; HIRATSUKA, T.; SASADO, T.; NARUSE, K.; YOSHIZAKI, G. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 43185, 3 mar. 2017.
- SHIBASAKI, Y.; TODA, H.; KOBAYASHI, I.; MORITOMO, T.; NAKANISHI, T. Kinetics of CD4+ and CD8α+ T-cell subsets in graft-versus-host reaction (GVHR) in ginebuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 10, p. 1075–1081, out. 2010.
- SILVA, M. A.; COSTA, G. M. J.; LACERDA, S. M. S. N.; BRANDÃO-DIAS, P. F. P.; KALAPOTHAKIS, E.; SILVA JÚNIOR, A. F.; ALVARENGA, E. R.; FRANÇA, L. R. Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 230–231, p. 48–56, maio 2016.

- SLATER, C. H.; SCHRECK, C. B. Physiological levels of testosterone kill salmonid leukocytes in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, v. 106, n. 1, p. 113–119, 1997.
- SOGO, T.; KAWAHARA, M.; UEDA, H.; OTSU, M.; ONODERA, M.; NAKAUCHI, H.; NAGAMUNE, T. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. **Cytokine**, v. 46, n. 1, p. 127–136, 2009.
- TAJIMA, A.; NAITO, M.; YASUDA, Y.; KUWANA, T. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). **Theriogenology**, v. 40, n. 3, p. 509–519, 1993.
- TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Biotechnology: Surrogate broodstock produces salmonids. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 629–630, 5 ago. 2004.
- VAN SAEN, D.; GOOSSENS, E.; DE BLOCK, G.; TOURNAYE, H. Regeneration of spermatogenesis by grafting testicular tissue or injecting testicular cells into the testes of sterile mice: a comparative study. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 5 SUPPL., p. 2264–2272, 2009.
- YOSHIZAKI, G.; SAKATANI, S.; TOMINAGA, H.; TAKEUCHI, T. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 364–371, 2000.

4 Considerações Finais

Na primeira parte deste estudo, foi possível verificar que o tacrolimus e a ciclosporina, dois imunossupressores comumente utilizados em mamíferos, possuem efeitos sobre as células imunológicas de trutas arco-íris e podem ser administrados em peixes por meio de emulsões. O tacrolimus e a ciclosporina afetam a expressão de citocinas ligadas ao NFAT e aqui demonstramos que os dois medicamentos foram capazes de inibir a expressão da *il2*, mas não a da *il4a* em truta arco-íris. Mesmo não possuindo efeitos sobre a expressão da *il4a*, o tacrolimus e a ciclosporina podem afetar outras isoformas deste gene. Assim a *il2* pode ser considerada um bom indicador de imunossupressão com tacrolimus ou ciclosporina.

Na segunda parte, demonstramos que o tacrolimus pode ser utilizado como um imunossupressor promissor em experimentos com enxertos. Os enxertos subcutâneos de testículo que foram tratados com 0,5 mg/kg de tacrolimus possuíam células germinativas na primeira semana e, presumivelmente, espermátides que sobreviveram por até cinco semanas após o transplante. A otimização da imunossupressão de tacrolimus em conjunto com outros tipos de imunossupressores pode permitir que enxertos de testículo possam ser mantidos por mais tempo, do que o período alcançado neste estudo. Dessa forma, a terapia com imunossupressores em peixes pode se tornar uma ferramenta eficiente nos transplantes de células germinativas em gônadas, ampliando a sua aplicação entre espécies distantes filogeneticamente e aumentando a eficiência na produção de gametas alógenos.

Referências Bibliográficas

- ANDERSSON, J.; NAGY, S.; GROTH, C. G.; ANDERSSON, U. Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. **Immunology**, v. 75, n. 1, p. 136–42, 1992.
- ARREGUI, L.; DOBRINSKI, I. Xenografting of testicular tissue pieces: twelve years of an in vivo spermatogenesis system. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 148, n. 5, p. R71, 2014.
- BHATTA, S.; IWAI, T.; MIURA, C.; HIGUCHI, M.; SHIMIZU-YAMAGUCHI, S.; FUKADA, H.; MIURA, T. Gonads directly regulate growth in teleosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11408–11412, 10 jul. 2012.
- BHUSHAN, S.; MEINHARDT, A. The macrophages in testis function. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 119, p. 107–112, 2017.
- BILLARD, R.; FOSTIER, A.; WEIL, C.; BRETON, B. Endocrine Control of Spermatogenesis in Teleost Fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 39, n. 1, p. 65–79, 1982.

- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1484–1506, set. 2014.
- BORDA, B.; LENGYEL, C.; VÁRKONYI, T.; KEMÉNY, É.; OTTLAKÁN, A.; KUBIK, A.; KERESZTES, C.; LÁZÁR, G. Side effects of the calcineurin inhibitor, such as new-onset diabetes after kidney transplantation. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 101, n. 3, p. 388–394, set. 2014.
- BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 24, p. 11298–11302, 22 nov. 1994.
- BUEHR, M.; MCLAREN, a; BARTLEY, a; DARLING, S. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 198, n. 3, p. 182–189, 1993.
- CALNE, R. Y.; ROLLES, K.; WHITE, D. J.; THIRU, S.; EVANS, D. B.; MCMASTER, P.; DUNN, D. C.; CRADDOCK, G. N.; HENDERSON, R. G.; AZIZ, S.; LEWIS, P. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8151, p. 1033–6, 17 nov. 1979.
- CARDWELL, T. N.; SHEFFER, R. J.; HEDRICK, P. W. MHC variation and tissue transplantation in fish. **The Journal of heredity**, v. 92, n. 4, p. 305–8, 2001.
- CLOUD, J. G. Surgical transplantation of sexually immature ovaries in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology**, v. 298, n. 1, p. 73–6, 2003.
- FARLORA, R.; HATTORI-IHARA, S.; TAKEUCHI, Y.; HAYASHI, M.; OCTAVERA, A.; ALIMUDDIN; YOSHIZAKI, G. Intraperitoneal Germ Cell Transplantation in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 309–320, 6 jun. 2014.
- FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5258, p. 50–53, 1996.
- FIJAK, M.; MEINHARDT, A. The testis in immune privilege. **Immunological Reviews**, v. 213, n. 1, p. 66–81, 2006.
- FISCHER, U.; UTKE, K.; SOMAMOTO, T.; KÖLLNER, B.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T. Cytotoxic activities of fish leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 209–226, 2006.
- GARCIA, S. C.; LOPES, L. dos S.; SCHOTT, K. L.; BECK, S. T.; POMBLUM, V. J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393–401, 2004.
- GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v. 21, n. 2, p. 345–357, 1981.
- GRIMHOLT, U. MHC and Evolution in Teleosts. **Biology**, v. 5, n. 1, p. 6, 2016.
- HALLECK, F.; FRIEDERSDORFF, F.; FULLER, T. F.; MATZ, M.; HUBER, L.; DÜRR, M.; SCHÜTZ, M.; BUDDE, K. New perspectives of immunosuppression. **Transplantation Proceedings**, v. 45, n. 3, p. 1224–1231, abr. 2013.
- HALLORAN, P. F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 26, p. 2715–2729, 23 dez. 2004.
- HAMASAKI, M.; TAKEUCHI, Y.; MIYAKI, K.; YOSHIZAKI, G. Gonadal Development and Fertility of Triploid Grass Puffer Takifugu niphobles Induced by Cold Shock Treatment. **Marine Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 133–144, 28 abr. 2013.
- HAMASAKI, M.; TAKEUCHI, Y.; YAZAWA, R.; YOSHIKAWA, S.; KADOMURA, K.; YAMADA, T.; MIYAKI, K.; KIKUCHI, K.; YOSHIZAKI, G. Production of Tiger Puffer Takifugu rubripes Offspring from Triploid Grass Puffer Takifugu niphobles Parents. **Marine Biotechnology**, p. 1–13, 23 set. 2017.

- HARRIS, J.; BIRD, D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 77, p. 163–176, 2000.
- HAYASHI, M.; SAKUMA, D.; YOSHIZAKI, G. Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. **Molecular Reproduction and Development**, 15 jan. 2018.
- HEIDT, S.; ROELEN, D. L.; EIJSINK, C.; EIKMANS, M.; VAN KOOTEN, C.; CLAAS, F. H. J.; MULDER, A. Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. **Clinical and experimental immunology**, v. 159, n. 2, p. 199–207, fev. 2010.
- HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H.; POLLEY, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocortical hormone in arthritis: preliminary report. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 8, n. 2, p. 97–104, jun. 1949.
- HERRID, M.; OLEJNIK, J.; JACKSON, M.; SUCHOWERSKA, N.; STOCKWELL, S.; DAVEY, R.; HUTTON, K.; HOPE, S.; HILL, J. R. Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 5, p. 898–905, 2009.
- HIGGINS, R. M.; HART, P.; LAM, F. T.; KASHI, H. Conversion from tacrolimus to cyclosporin in stable renal transplant patients: safety, metabolic changes, and pharmacokinetic comparison. **Transplantation**, v. 70, n. 1, p. 199–202, 15 jul. 2000.
- HILDEMAN, W. H. Tissue Transplantation Immunity in Goldfish. **Immunology**, v. 1, n. 1, p. 46, 1958.
- HONARAMOOZ, A.; MEGEE, S. O.; DOBRINSKI, I. Germ Cell Transplantation in Pigs1. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 21–28, 1 jan. 2002.
- INGULLI, E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. **Pediatric Nephrology**, v. 25, n. 1, p. 61–74, 2010.
- IWAMA, G.; NAKANISHI, T. THE FISH IMMUNE SYSTEM Environment. **Environment**, p. 395, 1996.
- KAGAWA, H. Oogenesis in Teleost Fish. **Aqua-BioScience Monographs**, v. 6, n. 4, p. 99–127, 2013.
- KANATSU-SHINOHARA, M.; OGONUKI, N.; INOUE, K.; OGURA, A.; TOYOKUNI, S.; HONJO, T.; SHINOHARA, T. Allogeneic Offspring Produced by Male Germ Line Stem Cell Transplantation into Infertile Mouse Testis1. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 167–173, 1 jan. 2003.
- KANG, S. J.; CHOI, J. W.; KIM, S. Y.; PARK, K. J.; KIM, T. M.; LEE, Y. M.; KIM, H.; LIM, J. M.; HAN, J. Y. Reproduction of Wild Birds via Interspecies Germ Cell Transplantation1. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 5, p. 931–937, 2008.
- KAUR, G.; MITAL, P.; DUFOUR, J. M. Testisimmune privilege - Assumptions versus facts. **Animal reproduction**, v. 10, n. 1, p. 3–15, jan. 2013.
- KLEIN, I. H. H. T.; ABRAHAMS, A.; VAN EDE, T.; HENÉ, R. J.; KOOMANS, H. A.; LIGTENBERG, G. Different effects of tacrolimus and cyclosporine on renal hemodynamics and blood pressure in healthy subjects. **Transplantation**, v. 73, n. 5, 2002.
- KUJAWSKI, S.; LIN, W.; KITTE, F.; BÖRMEL, M.; FUCHS, S.; ARULMOZHIVARMAN, G.; VOGT, S.; THEIL, D.; ZHANG, Y.; ANTOS, C. L. Calcineurin Regulates Coordinated Outgrowth of Zebrafish Regenerating Fins. **Developmental Cell**, v. 28, n. 5, p. 573–587, 2014.
- LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y.; MORITA, T.; YOSHIZAKI, G.; FRANÇA, L. R. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 3–11, 2013.

- LAING, K. J.; HANSEN, J. D. Fish T cells: Recent advances through genomics. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1282–1295, 2011.
- LEE, D. B. Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. **Kidney international**, v. 52, n. 1, p. 248–60, jul. 1997.
- LEE, S.; IWASAKI, Y.; SHIKINA, S.; YOSHIZAKI, G. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 5, p. 1640–1645, 2013.
- LI, N.; WANG, T.; HAN, D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 152, 11 jun. 2012.
- LIESCHKE, G. J.; TREDE, N. S. Fish immunology. **Current Biology**, v. 19, n. 16, p. R678–R682, ago. 2009.
- MACIAN, F. NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 6, p. 472–484, 2005.
- MADDOCKS, S.; SETCHELL, B. P. Recent evidence for immune privilege in the testis. **Journal of reproductive immunology**, v. 18, n. 1, p. 9–18, ago. 1990.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137–151, fev. 2006.
- MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. M.; STRÜSSMANN, C. A. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; YOKOTA, M.; WATANABE, S.; STRÜSSMANN, C. A. Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germlines. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6132, 2 jul. 2009.
- MAJHI, S. K.; KUMAR, S. Germ Cell Transplantation: A Potential Tool for Propagation of Endangered Fishes. **Annals of Aquaculture and Research**, 2017.
- MAÑANOS, E., DUNCAN, N. & MYLONAS, C. C. (2008). Reproduction and control of ovulation, spermatation and spawning in cultured fish. IN CABRITA, E., ROBLES, V. & HERRÁEZ, M. P. (Eds.). **Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species.**, p. 1–66, 2008.
- MAULE, A. G.; SCHROCK, R.; SLATER, C.; FITZPATRICK, M. S.; SCHRECK, C. B. Immune and endocrine responses of adult chinook salmon during freshwater immigration and sexual maturation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 6, n. 3, p. 221–233, 1996.
- MIROUX, C.; MORALES, O.; GHAZAL, K.; OTHMAN, S. Ben; DE LAUNOIT, Y.; PANCRÉ, V.; CONTI, F.; DELHEM, N. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. **Transplantation**, v. 94, n. 2, p. 123–31, 27 jul. 2012.
- MOREL, S.; DIDIERLAURENT, A.; BOURGUIGNON, P.; DELHAYE, S.; BARAS, B.; JACOB, V.; PLANTY, C.; ELOUAHABI, A.; HARVENGT, P.; CARLSEN, H.; KIELLAND, A.; CHOMEZ, P.; GARÇON, N.; VAN MECHELEN, M. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. **Vaccine**, v. 29, n. 13, p. 2461–2473, 16 mar. 2011.
- MORITA, T.; KUMAKURA, N.; MORISHIMA, K.; MITSUBOSHI, T.; ISHIDA, M.; HARA, T.; KUDO, S.; MIWA, M.; IHARA, S.; HIGUCHI, K.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of Donor-Derived Offspring by Allogeneic Transplantation of Spermatogonia in the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 6, p. 1–11, 2012.
- MORITA, T.; MORISHIMA, K.; MIWA, M.; KUMAKURA, N.; KUDO, S.; ICHIDA, K.; MITSUBOSHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Functional Sperm of the Yellowtail

- (*Seriola quinqueradiata*) Were Produced in the Small-Bodied Surrogate, Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*). **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 644–654, 4 out. 2015.
- MYERS, B. D.; ROSS, J.; NEWTON, L.; LUETSCHER, J.; PERLROTH, M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 11, p. 699–705, 13 set. 1984.
- NAGLER, J. J.; CLOUD, J. G.; WHEELER, P. A.; THORGAARD, G. H. Testis transplantation in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biology of reproduction**, v. 64, n. 2, p. 644–646, 1 fev. 2001.
- NAKANISHI, T.; FISCHER, U.; DIJKSTRA, J. M.; HASEGAWA, S.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; OTOTAKE, M. Cytotoxic T cell function in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n. 2, p. 131–139, 2002.
- NAKANISHI, T.; SHIBASAKI, Y.; MATSUURA, Y. T Cells in Fish. **Biology**, v. 4, n. 4, p. 640–663, 2015.
- NORRIS, D. O.; JONES, R. E. **Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles**. Boston, MA: Springer US, 1987.
- OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of Trout Offspring from Triploid Salmon Parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517–1517, 14 set. 2007.
- OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2725–2729, 21 fev. 2006.
- PANDEY, R.; BOTROS, M. A.; NACEV, B. A.; ALBIG, A. R. Cyclosporin a disrupts notch signaling and vascular lumen maintenance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.
- PATÍÑO, R.; SULLIVAN, C. V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 57–70, 2002.
- PETERSDORF, E. W. Hla matching in allogeneic stem cell transplantation. **Current Opinion in Hematology**, v. 11, n. 6, p. 386–391, 1 nov. 2004.
- PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J. C.; FLAJŠHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v. 293, n. 3–4, p. 125–156, 2009.
- POTTEN, C. . Cell lineages. In: MCGEE, J.; ISAACSON, P.; WRIGHT, N. (Ed.). **Oxford textbook of Pathology**. first ed. [s.l.] Oxford University Press, 1992. p. 43–52.
- POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. **General and Comparative Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 122–132, 1999.
- PRATSCHKE, J.; NEUHAUS, R.; TULLIUS, S. G.; HALLER, G. W.; JONAS, S.; STEINMUELLER, T.; BECHSTEIN, W.-O.; NEUHAUS, P. TREATMENT OF CYCLOSPORINE-RELATED ADVERSE EFFECTS BY CONVERSION TO TACROLIMUS AFTER LIVER TRANSPLANTATION. **Transplantation**, v. 64, n. 6, 1997.
- QIN, Q. W.; OTOTAKE, M.; NAGOYA, H.; NAKANISHI, T. Graft-versus-host reaction (GVHR) in clonal amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, n. 1–2, p. 83–89, 2002.
- RATHEE, P. et al. Immunosuppressants : A Review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 1, p. 1–12, 2013.
- RODRIGUEZ-SOSA, J. R.; TANG, L.; DOBRINSKI, I. Testicular Tissue Grafting and Male Germ Cell Transplantation. In: [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 489–500.
- ROLLAND, A. D.; LAREYRE, J. J.; GOUPIL, A. S.; MONTFORT, J.; RICORDEL, M. J.; ESQUERRÉ, D.; HUGOT, K.; HOULGATTE, R.; CHALMEL, F.; LE GAC, F. Expression

- profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1–22, 2009.
- ROMBOUT, J.; HUTTENHUIS, H.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, n. 5, p. 441–455, nov. 2005.
- ROSTAING, L.; PUYOO, O.; TKACZUK, J.; PERES, C.; ROUZAUD, A.; CISTERNE, J. M.; DE PREVAL, C.; OHAYON, E.; DURAND, D.; ABBAL, M. Differences in Type 1 and Type 2 intracytoplasmic cytokines, detected by flow cytometry, according to immunosuppression (cyclosporine A vs. tacrolimus) in stable renal allograft recipients. **Clinical Transplantation**, v. 13, n. 5, p. 400–409, 1999.
- SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation1. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 1, p. 159–166, 2008.
- SAITO, T.; PSENICKA, M. Novel Technique for Visualizing Primordial Germ Cells in Sturgeons (*Acipenser ruthenus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. baerii*, and *Huso huso*)1. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 4, 1 out. 2015.
- SEKI, S.; KUSANO, K.; LEE, S.; IWASAKI, Y.; YAGISAWA, M.; ISHIDA, M.; HIRATSUKA, T.; SASADO, T.; NARUSE, K.; YOSHIKAWA, G. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 43185, 3 mar. 2017.
- SHIBASAKI, Y.; TODA, H.; KOBAYASHI, I.; MORITOMO, T.; NAKANISHI, T. Kinetics of CD4⁺ and CD8 α ⁺ T-cell subsets in graft-versus-host reaction (GVHR) in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorffii*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 10, p. 1075–1081, out. 2010.
- SILVA, M. A.; COSTA, G. M. J.; LACERDA, S. M. S. N.; BRANDÃO-DIAS, P. F. P.; KALAPOTHAKIS, E.; SILVA JÚNIOR, A. F.; ALVARENGA, E. R.; FRANÇA, L. R. Successful xenogeneic germ cell transplantation from *Jundia catfish* (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 230–231, p. 48–56, maio 2016.
- SLATER, C. H.; SCHRECK, C. B. Physiological levels of testosterone kill salmonid leukocytes in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, v. 106, n. 1, p. 113–119, 1997.
- SOGO, T.; KAWAHARA, M.; UEDA, H.; OTSU, M.; ONODERA, M.; NAKAUCHI, H.; NAGAMUNE, T. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. **Cytokine**, v. 46, n. 1, p. 127–136, 2009.
- SOMAMOTO, T.; KONDO, M.; NAKANISHI, T.; NAKAO, M. Helper function of CD4⁺ lymphocytes in antiviral immunity in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorffii*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 44, n. 1, p. 111–115, 2014.
- SOMAMOTO, T.; YOSHIURA, Y.; SATO, A.; NAKAO, M.; NAKANISHI, T.; OKAMOTO, N.; OTOTAKE, M. Expression profiles of TCR β and CD8 α mRNA correlate with virus-specific cell-mediated cytotoxic activity in ginbuna crucian carp. **Virology**, v. 348, n. 2, p. 370–377, 2006.
- SPENCER, C. M.; GOA, K. L.; GILLIS, J. C. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. **Drugs**, v. 54, n. 6, p. 925–75, dez. 1997.
- STEIN-STREILEIN, J.; CASPI, R. R. Immune privilege and the philosophy of immunology. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. MAR, p. 2–3, 2014.
- SUNYER, J. O. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. **Nature Immunology**, v. 14, n. 4, p. 320–326, 19 mar. 2013.

- TAJIMA, A.; NAITO, M.; YASUDA, Y.; KUWANA, T. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). **Theriogenology**, v. 40, n. 3, p. 509–519, 1993.
- TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Biotechnology: Surrogate broodstock produces salmonids. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 629–630, 5 ago. 2004.
- TAKIZAWA, F.; MAGADAN, S.; PARRA, D.; XU, Z.; KORYTÁŘ, T.; BOUDINOT, P.; SUNYER, J. O. Novel Teleost CD4-Bearing Cell Populations Provide Insights into the Evolutionary Origins and Primordial Roles of CD4⁺ Lymphocytes and CD4⁺ Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 11, p. 4522–4535, 2016.
- TEDESCO, D.; HARAGSIM, L. Cyclosporine: A Review. **Journal of Transplantation**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- THOMSON, A. W.; BONHAM, C. A.; ZEEVI, A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. **Therapeutic drug monitoring**, v. 17, n. 6, p. 584–91, dez. 1995.
- TODA, H.; SHIBASAKI, Y.; KOIKE, T.; OHTANI, M.; TAKIZAWA, F.; OTOTAKE, M.; MORITOMO, T.; NAKANISHI, T. Alloantigen-specific killing is mediated by CD8-positive T cells in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 646–652, 2009.
- URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486–503, 2011.
- URIBE, M. C.; GRIER, H. J.; MEJÍA-ROA, V. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 3, p. e983400, 2014.
- VAN SAEN, D.; GOOSSENS, E.; DE BLOCK, G.; TOURNAYE, H. Regeneration of spermatogenesis by grafting testicular tissue or injecting testicular cells into the testes of sterile mice: a comparative study. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 5 SUPPL., p. 2264–2272, 2009.
- WANG, T.; JOHANSSON, P.; ABÓS, B.; HOLT, A.; TAFALLA, C.; JIANG, Y.; WANG, A.; XU, Q.; QI, Z.; HUANG, W.; COSTA, M. M.; DIAZ-ROSALES, P.; HOLLAND, J. W.; SECOMBES, C. J. First in-depth analysis of the novel Th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities. **Oncotarget**, v. 7, n. 10, p. 10917–10946, 2016.
- WANG, T.; SECOMBES, C. J. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1703–1718, 2013.
- WHITING, P. H.; THOMSON, A. W.; BLAIR, J. T.; SIMPSON, J. G. Experimental cyclosporin A nephrotoxicity. **British journal of experimental pathology**, v. 63, n. 1, p. 88–94, fev. 1982.
- WISEMAN, A. C. Immunosuppressive Medications. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 332–343, 5 fev. 2016.
- WONG, T.-T.; SAITO, T.; CRODIAN, J.; COLLODI, P. Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae1. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 6, p. 1190–1197, 1 jun. 2011.
- WYLIE, C. Germ cells. **Cell**, v. 96, p. 165–174, 1999.
- YOSHIDA, S. Stem cells in mammalian spermatogenesis. **Development, Growth & Differentiation**, v. 52, n. 3, p. 311–317, 2010.
- YOSHIZAKI, G.; SAKATANI, S.; TOMINAGA, H.; TAKEUCHI, T. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 364–371, 2000.