ERYKA ZOLCSÁK DE SOUSA

Avaliação da resposta imunológica envolvida em transplante de células germinativas de Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) em Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

Tese 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 Doutora em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

Coorientador:

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. 3690
FMVZ

Sousa, Erika Zolcsak de
Avaliação da resposta imunológica envolvida em transplante de células germinativas de Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) em Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) / Erika Zolcsak de Sousa. – 2018.
60 f. : il.

Doutorado (Tese) – 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 Jr.
Coorientador: Dr. Ricardo Shohei Hattori.

1. Peixe. 2. Reprodução. 3. Salmão do atlântico. 4. Xenotransplante. 5. Truta arco-íris. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da resposta imunológica envolvida em transplante de células germinativas de Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) em Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)", protocolada sob o CEUA nº 1331130716, sob a responsabilidade de **José Roberto Kfoury Júnior e equipe; Erika Zolcsák de Sousa** - 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 **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 21/06/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the immune response in transplantation of germ cells from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", utilizing 170 Fishes (170 males), protocol number CEUA 1331130716, under the responsibility of **José Roberto Kfoury Júnior and team; Erika Zolcsák de Sousa** - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/21/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2015** a **07/2018**

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

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos**

idade: **05 a 36 meses**

N: **30**

Linhagem: **Salmo salar**

Peso: **100 a 1000 g**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos**

idade: **05 a 36 meses**

N: **140**

Linhagem: **Oncorhynchus mykiss**

Peso: **100 a 1000 g**

Resumo: Devido ao consumo predatório e ao risco inerente de extinção em várias espécies de peixes, pesquisadores têm buscado técnicas alternativas de reprodução para viabilizar tanto o cultivo como a conservação ex situ. O transplante xenogênico de células germinativas representa uma técnica reprodutiva inovadora e já possui resultados promissores em diversas espécies de mamíferos, aves, insetos e também de peixes. No entanto, a baixa eficiência na geração de gametas alógenos consiste uma das limitações desta técnica. Um dos possíveis motivos seria o desencadeamento de reações de rejeição por parte do hospedeiro, comum em transplante de órgãos e tecidos humanos. Dentro deste contexto, este projeto visa identificar e avaliar a interferência destes mecanismos durante o processo de transplante de células germinativas de salmão do Atlântico em truta arco-íris, identificando possíveis respostas do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) e dos linfócitos CD4+ e CD8+. Tais avaliações serão feitas utilizando as técnicas de histologia, PCR, qRT-PCR, e imuno-histoquímica. Espera-se com base nos resultados deste estudo, desenvolver estratégias de modulação do sistema imune para a otimização desta técnica reprodutiva, visando o aumento da viabilidade das células transplantadas e ultimamente o aumento da produção de gametas.

Local do experimento: Estação Experimental de Salmonicultura □ Ascânio de Faria □, situada em Campos do Jordão □ SP

São Paulo, 22 de junho de 2018

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUSA, Eryka Zolcsák

Título: Avaliação da resposta imunológica envolvida em transplante de células germinativas de Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) em Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

Tese 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 Doutora em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Aos animais, pois sem eles nada disso seria possível...

A Deus, por sempre guiar o meu caminho...

Aos meus pais, por me ensinarem o valor do trabalho e da vida, e dedicarem grande parte da sua para meu crescimento pessoal e profissional, esse trabalho é de vocês também...

Ao meu irmão Thyago, cunhada-irmã Dani, tia-mãe Susi, pela força e ternura familiar...

Aos meus cães Thor, Brisa e Fofão, coelha Judith, e cavalo Poeta, pela alegria e companheirismo de todos os dias...

A minha eterna avó Gabriella, pois sei que está me guiando e muito feliz por mais esse passo dado... Saudades.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr; por acreditar em meu potencial, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao meu coorientador Ricardo Shorei Hattori, pelos ensinamentos adquiridos.

A Dra. Yara Aiko Tabata, juntamente com a APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Campos do Jordão pela concessão do material.

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), do Instituto de Biociências (IB), do Instituto Oceanográfico (IO) e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, pelas disciplinas ministradas, onde cada uma me ajudou de alguma forma para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez e colegas do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica, André Luiz Veiga Conrado e Diogo Nader Palermo pelo auxílio nas técnicas de imuno-histoquímica, sem vocês, este trabalho não seria realizado.

Aos Funcionários do Setor de Anatomia Veterinária, e alunos, pela amizade e convivência.

Aos funcionários da APTA – Campos do Jordão, pelo apoio e cuidado com meus animais, Lé, Purginha e Rosana, os meus sinceros agradecimentos!

A Sra. Branca Jordão e Fernando, pela hospitalidade em sua pousada e apoio de sempre!

A todos, o meu agradecimento!

"Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do homem... Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda. Toda criatura em desgraça tem o mesmo direito a ser protegida."

São Francisco de Assis

RESUMO

Sousa, E.Z **Avaliação da resposta imunológica envolvida em transplante de células germinativas de Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) em Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)** 2018. 60 f.

Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Devido ao consumo predatório e ao risco inerente de extinção de várias espécies de peixes, pesquisadores têm buscado técnicas alternativas de reprodução para viabilizar tanto o cultivo como a conservação *ex situ*. Os transplantes xenogênicos de gônadas representam uma técnica reprodutiva inovadora e já existem resultados promissores em diversas espécies de mamíferos, aves, insetos e também de peixes. No entanto, a baixa eficiência na geração de gametas alógenos consiste em uma das limitações desta técnica. Um dos possíveis motivos seria o desencadeamento de reações de rejeição por parte do hospedeiro, comum em transplante de órgãos e tecidos humanos. Dentro deste contexto, visamos identificar e avaliar a interferência destes mecanismos durante o processo de enxerto de gônada de truta arco-íris entre linhagens diferentes e salmão do Atlântico, identificando possíveis graus de respostas imunológicas utilizando enxertos autógenos, isógenos, alógenos e xenógenos. Tais avaliações foram feitas pela análise histopatológica dos tecidos transplantados e dos locais dos implantes. Com os resultados obtidos, pudemos avaliar que a resposta imunológica em implantes de tecidos alogênicos e xenogênicos é bem evidente. Já no enxerto de células germinativas dissociadas houve apenas um discreto processo inflamatório em todas as variações dos enxertos, o que pode representar uma adaptação técnica viável e mais eficaz para a obtenção de gametas.

Palavras-chave: Peixe, reprodução, salmão do atlântico, xenotransplante, truta arco-íris.

ABSTRACT

Sousa, E.Z. **Evaluation of the immune response in transplantation of germ cells from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)** . 2018. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Due the predatory consumption and the inherent risk of extinction of various species of the fish, investigate the alternatives of reproduction to make viable the cultivation as an ex situ. Xenogeneic transplants of gonads represent an innovative reproductive technique and those that can already be found in various species of animals, birds, insects and fish. However, a low efficiency in the range of allogenic gametes is one of the limitation of this technique. A probable cause would be related to an immune response process that would lead to rejection of the transplanted tissue, as observed in organs and tissues transplantation in human. In this context, we aimed to identify and to evaluate the presence of immune rejection mechanisms during the process of gonads tissues transplantation among different rainbow trout lineages and to Atlantic salmon, observing possible response degrees according to the nature of the graft: autogenic, isogenic, allogeneic or xenogeneic transplantations. Histopathological analysis of the transplanted tissues and of the implanted sites were conducted. Results showed a clear evidence of an immune response in allogeneic and xenogeneic implants. Dissociated gonad cells grafts showed a discrete inflammatory process disregarding the graft nature, that may be an indication of a feasible and more efficient technique adaption to obtain viable gametes.

Keywords: Fish, *Oncorhynchus mykiss*, reproduction, *Salmo salar*, xenotransplantation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **APTA** (Agência Paulista de Tecnologia e Agronegócios)
- **GG** – Truta linhagem Golden
- **MHC** – Complexo Maior de Histocompatibilidade
- **JJ** – Truta linhagem Jordanense
- **RTPcr** – Real Time polymerase chain reaction
- **SA** - Salmão
- **SS**- Truta linhagem Shasta
- **TA** – Truta azul receptoraTCB – Truta controle Branco
- **TCC** – Truta controle cirúrgico
- **TGD** - Golden Doador
- **TGI** – Golden Receptor Irmão
- **TR** – Truta Receptora

SUMÁRIO

1.Introdução Geral	14
2.Objetivos	17
3. Capitulo 1 – Implante de Tecido	18
3.1. .Introdução	19
3.2 .Materiais e Métodos	21
3.3. Resultados	26
3.4. Discussão	34
4. Capitulo 2 – Transplante de células Germinativas	38
4.1. Introdução	39
4.2. Materiais e Métodos	41
4.3. Resultados	47
4.4. Discussão	53
5. Considerações Finais	55
6. Referências Bibliográficas	56

Introdução Geral

Barriga de aluguel em peixes

Estudos atuais indicam que se a destruição ambiental e a pesca predatória continuarem no ritmo em que se encontram, todo o recurso pesqueiro se acabará em 40 anos (Worm et al. 2006). Na última década, muitas espécies de salmonídeos tiveram redução significativa e muitas entraram para a lista de animais em extinção, segundo relatório U.S. Fish & Wildlife Service (2015). Essa redução mundial de salmonídeos tem exigido estratégias para reestabelecer as populações ameaçadas (TAKEUCHI et al., 2004).

Com base nesses estudos, pesquisadores vêm desenvolvendo diversas técnicas de reprodução e conservação, visando minimizar os impactos causados pelo homem nas espécies ameaçadas. Porém, a criação de animais em cativeiro envolve diversos riscos, como desenvolvimento de doenças, e a inaptidão destes animais cativos em se habituar a ambientes naturais (TSUKAMOTO et al., 2008).

A criopreservação de gametas e embriões é uma técnica de reprodução que não oferece tais riscos. A princípio, trata-se de uma preservação permanente de recursos genéticos, além de mais econômica. No entanto, a criopreservação de peixes e ovos ainda encontra diversas limitações, devido ao grande tamanho desses ovos, a baixa permeabilidade do cório e seu alto teor de gordura (CHAO E LIAO., 2001).

Como método alternativo para a preservação de peixes, novas técnicas reprodutivas foram desenvolvidas, como a “barriga de aluguel” (“surrogate broodstock”), onde as células germinativas imaturas de uma espécie de peixe-alvo são transplantadas para uma espécie relacionada de fácil reprodução e maturação, de

modo que a espécie a fim pode então produzir espermatozoides e óvulos da espécie-alvo (YOSHIZAKI et al., 2002; OKUTSU et al., 2006).

Células germinativas primordiais (PGCs) são células ideais do doador por causa de seu potencial para se desenvolver em qualquer gameta masculino ou feminino (YOSHIZAKI et al., 2002). Elas têm sido transplantadas com sucesso a partir de uma espécie para outra em *Drosophila* (LAWRENCE et al., 1993) e em pintinhos (ONO et al., 1996).

Recentemente, pesquisadores japoneses obtiveram sucesso em obter trutas (*Oncorhynchus mykiss*) derivadas de espermatozoides de salmão masu (*O. masou*) transplantados na cavidade peritoneal de trutas arco-íris (YOSHIZAKI et al., 2002). Contudo, esta técnica ainda possui efetividade muito baixa, e uma provável razão para tal poderia estar relacionada à rejeição das células do doador pelo sistema imunológico do hospedeiro.

Rejeição imunológica em transplantes

Aloantígenos são moléculas interpretadas como estranhas ao organismo, oriundas de um órgão ou tecido derivados de um indivíduo geneticamente diferente. A resposta imune para aloantígenos pode ser humoral ou celular, sendo a última mais importante para rejeição de órgãos transplantados, apesar da contribuição de anticorpos. O reconhecimento de células transplantadas como próprias ou estranhas é determinado por uma herança de genes codominantes. (MAGALHÃES et al. 2004; ABBAS et al. 2015).

As tentativas de transplantes ocorreram principalmente a partir da Segunda Guerra Mundial, mas sem sucesso (MIES et al 2005). Isso levou diversos pesquisadores ao estudo de transplantes em modelos animais. Pesquisas sobre rejeição de transplantes entre camundongos de uma mesma linhagem genética (isogênicos) e entre camundongos geneticamente diferentes (alogênicos) permitiram aos cientistas a identificação do sistema MHC. Houve também um grande desenvolvimento de

técnicas para evitar a rejeição de tecidos, revolucionando dessa forma esta área da medicina. (MAGALHÃES et al. 2004).

Ainda segundo Magalhães et al. (2004), o Complexo de Histocompatibilidade Principal, ou MHC (*Major Histocompatibility Complex*) tem importância fundamental na resposta imunológica, incluindo a seleção das células T, indução de tolerância, produção de anticorpos, imunidade mediada pelas células T, respostas inflamatórias e diversos outros fatores ligados ao sistema imune e seu funcionamento. Sabe-se que o sistema MHC é o responsável por quase todas as rápidas reações de rejeição ao enxerto (ABBAS et al. 2015).

Até o momento, genes para a molécula de MHC classe Ia, bem como classe IIa IIb foram relatados em 25 espécies de teleósteos e elasmobrânquios, o que indica que o sistema imune adaptativo já é complexo em peixes (MANNING et al; 1996 e STET et al; 1996).

As células T podem induzir a destruição do tecido em doenças autoimunes e a rejeição de aloenxertos, mas também podem agir na regulação de ambos os processos (ADAMS, HUTCHINSON 1997; STARZ et al., 1992). A atividade excessiva das células T pode limitar a magnitude da resposta imune, que pode por sua vez resultar na falha do controle de uma infecção. Além disso, a ausência de ação do linfócito T regulador pode resultar em inflamação intensa e rejeição de órgãos de maneira autoimune.

A identificação da resposta imunológica em diferentes tipos de transplantes: enxertos autógenos, isógenos, alógenos, e xenógenos é importante para o entendimento do mecanismo de ação dessa resposta, podendo trazer informações relevantes para a melhoria da técnica de “barriga de aluguel” em salmonídeos.

Objetivos

Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar se há a presença ou não de uma resposta imunológica envolvida em transplantes de células germinativas.

Específico

Avaliar a presença ou não de resposta imunológica em transplante de células germinativas nas condições de enxertos autógenos, isógenos, alógenos e xenógenos.

Capítulo I

Implante de Tecido

Resposta imunológica observada em enxertos subcutâneos autógenos, isógenos, alógenos, e xenógenos em salmonídeos

Introdução

O transplante de tecido gonadal, onde o testículo ou parte dele é enxertado em outro indivíduo é uma técnica conhecida (BHATTA et al., 2012).

A distância genética entre o doador e o receptor é uma dificuldade para o sucesso da técnica de transplante de tecido, devido à alta resposta imunológica e índice de rejeição. A gametogênese em animais transplantados depende de certas compatibilidades entre doador e receptor (KAGAWA, 2013), a espermatogênese parece ser um processo que não depende tanto desta compatibilidade, como evidenciado 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 et al, 2012; STEIN-STREILEIN; et al 2014).

Para minimizar a rejeição, animais triploides foram utilizados como receptores, visto que estes são normalmente estéreis devido à divisão irregular dos cromossomos durante a meiose (PIFERRER et al., 2009). No caso de machos triploides, eles são capazes de produzir espermatozoides aneuploides que, embora ativem os ovócitos, produzem embriões inviáveis que morrem durante o desenvolvimento embrionário (LEE et al., 2013). Enxertos de testículo em trutas arco-íris isogênicas são capazes de sofrer maturação e produzir espermatozoides viáveis (NAGLER et al., 2001)

Os macrófagos possuem grande papel na manutenção do imunoprivilégio do testículo, conferindo proteção para o desenvolvimento dos espermatozoides, além de ser o principal apresentador de antígenos em um testículo normal e durante uma inflamação (BHUSHAN et al 2017).

Os primeiros transplantes de peixes foram realizados com peles e escamas (IWAMA; NAKANISHI, 1996), onde a região começou a ser invadida por células imunológicas e as células do doador foram gradualmente destruídas (HILDEMANN,

1958). Outros estudos demonstraram infiltrados inflamatórios como células T CD4 nas escamas transplantadas seguidas de células T CD8 e células B. Macrófagos e granulócitos agiam em conjunto com as células T para completar a rejeição alográfica (SHIBASAKI et al., 2010).

A identificação da resposta imunológica envolvida em transplante de tecidos, de forma a comparar a resposta quanto à distância filogenética, pode ser uma ferramenta potencial para a melhoria da técnica de barriga de aluguel.

Foram utilizadas 100 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), machos, de 1 ano e (peso médio de 300 g e comprimento padrão médio de 250 cm), 20 salmões do Atlântico (*Salmo salar*), machos, de 2 anos (peso médio de 400 g e comprimento padrão médio de 300 cm).

Os animais foram submetidos a transplantes alogênicos, xenogênicos, isogênico e autogênicos, conforme esquema abaixo, na *Estação Experimental de Salmonicultura* “Ascânio de Faria”, situada em Campos do Jordão – SP, administrada pela APTA (Agência Paulista de Tecnologia e Agronegócios).

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP, certificado nº 1331130716.

O enxerto

As trutas doadoras foram anestesiadas em solução de Benzocaína (proporção de 1:10000), por aproximadamente 2 minutos, e então retiradas da água e colocadas em suporte, na posição de decúbito dorsal, e foram submetidas ao procedimento cirúrgico. Foi realizada uma incisão na parte ventral, onde o testículo esquerdo foi excisado na região anterior e posterior, sendo retirado totalmente. As brânquias dos animais foram irrigadas constantemente com uma pipeta com água para a manutenção da vida dos mesmos. Após o procedimento, foi realizada uma sutura com fio de seda 3-0 e os animais voltaram a água corrente, para recuperação.

A gônada foi corada com azul de metileno e seccionada em 4 partes para ser transplantada.

Os animais que receberam o enxerto subcutâneo da gônada do doador foram submetidos à solução de Benzocaína (proporção de 1:10000) por aproximadamente 2 minutos, então, retirados da água e colocados no suporte, na posição de decúbito ventral. Foi realizada uma incisão subcutânea no dorso (aproximadamente 1cm anterior da nadadeira dorsal) do lado esquerdo, onde o testículo do animal doador foi inserido. A todo o momento, as brânquias foram irrigadas com pipetas com água para manutenção dos animais. Realizado o procedimento, os animais retornaram à água para recuperação.

Os animais controle cirúrgico foram operados conforme o doador, e receberam apenas azul de metileno em seu dorso para controle da reação.

Indução de triploidia por choque térmico

Para serem utilizados como recipientes foram gerados animais triploides, visto que estes são geralmente estéreis, a partir de choque térmico usando ovócitos de truta arco-íris das linhagens Jordanense (JJ) ou Shasta (SS) e sêmen de macho da linhagem Golden (GG). Após a fertilização artificial, os ovos fertilizados foram

incubados a 10°C por 10 minutos e em seguida transferidos imediatamente e submetidos a um choque térmico a 28°C por 20 minutos para evitar a liberação do corpúsculo polar. Os ovos embrionados foram mantidos em gavetas de incubação com sistema aberto e a uma temperatura que variava entre 9 e 13°C. A triploidia foi verificada por observação direta do padrão de cores de larvas recém-eclodidas que nos híbridos adquire a cor parda e também pela medição dos diâmetros maior e menor das hemácias preparadas pela técnica de esfregaço.

Histopatológico

As amostras de tecidos foram coletadas das regiões enxertadas nos 7°, 14°, 21° e 35° dias pós-enxerto.

O material foi fixado em paraformaldeído 4% por 48 horas, sendo então fixado em álcool 70% para posterior inclusão em parafina, esta feita com banhos crescentes de álcool, 70, 90 e 100% (4 horas cada), 3 banhos de Xilol (3 horas cada), 2 banhos em parafina (3 horas cada) e finalmente, inclusão do material utilizando formas apropriadas.

Os cortes histológicos de parafina foram realizados com 3µm de espessura e submetidos a desparafinização com 3 banhos de Xilol (10 minutos cada), reidratação em banhos de soluções alcoólicas decrescentes, 100, 90 e 70% (20 minutos cada) e então realizamos a com Hematoxilina por 1 minuto, lavadas em água corrente durante 2 minutos e coradas com Eosina por 2 minutos.

Para realização das análises histopatológicas foi utilizado o Microscópio Olympus bx60, (FMVZ-USP, São Paulo – Brasil).

RTPCR

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 TRIzol™ 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.

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

Análise estatística

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 $p < 0,05$.

Resultados

Na primeira semana pós enxerto foi evidenciado uma proliferação de monócitos, eritrócitos, e células de muco no grupo doador (autogênico) (Figura 1A).

Houve um aumento de células da vascularização com diversos eritrócitos, e células de muco. Há também um início de necrose no tecido no grupo irmão (isogênico)(Figura 1B).

No grupo alogênico, onde os animais eram de linhagem diferente, houve uma reação similar com o grupo irmão, porém com maior presença de linfócitos e monócitos (Figura 1C).

O grupo xenogênico, onde o enxerto foi realizado em outra espécie, a resposta imunológica foi bem evidente, onde pode-se observar uma necrose avançada do músculo, além de diversos linfócitos, eritrócitos e monócitos (Figura 1D).

No grupo controle cirúrgico, os eritrócitos sugerem um leve aumento de vascularização no local (Figura 1E).

Na terceira semana pós-enxerto pode-se notar um maior número de monócitos, eritrócitos e linfócitos, além de células de muco nos grupos Alogênicos, Isogênicos e Xenogênicos (Figura 2 B,C e D).

No grupo controle há uma quantidade menor de eritrócitos do que no período anterior (Figura 2E).

Na quinta semana pós-enxerto é possível observar a maturação da gônada implantada no autoenxerto, com a presença de cistos de espermatídes células de Sertoli e espermatozeugmatas (Figura 3A).

Nos grupos isogênicos e alogênicos ainda ocorre uma proliferação de células de imunológicas, como linfócitos, eritrócitos, trombócitos além de células de muco na

região do enxerto. Ainda no grupo alogênico, foi possível notar alguns centros de melanomacrófagos (Figura 3B e C).

No grupo xenogênico ocorre a presença de alguns linfócitos e eritrócitos, sendo este similar ao grupo controle cirúrgico (Figura 3 D).

1ª Semana pós-enxerto

Figura 1: Histomicrografias de cortes transversais, 1ª semana pós-enxerto.

A: Truta Golden Doadora (TGD). O quadrado representa a região do enxerto (barra de escala 100µm); **a:** é possível observar um grande processo inflamatório, com a presença de monócitos (setas pretas curtas), eritrócitos (setas pretas longas) e células de muco (setas brancas) (barra de escala 100µm).

B: Truta Golden Receptor Irmão (TGI). O círculo representa a região do enxerto, podemos observar o aumento da vascularização com diversos eritrócitos (setas longas) e também a presença de células de muco (setas curtas) (barra de escala 100µm); **b:** Nota-se a presença de células de muco (setas curtas); eritrócitos (setas longas) e linfócitos (setas vermelhas); nesta imagem podemos observar também uma área de necrose. (barra de escala 20µm).

C: Truta Azul Receptora (TA). O quadrado representa a região do enxerto, podemos observar o aumento da vascularização com diversos eritrócitos (seta) (barra de escala 100µm); **c:** É possível observar a presença de células de muco (setas curtas); eritrócitos (setas longas), linfócitos (células vermelhas) e monócitos (seta amarela) nesta imagem podemos observar também uma área de necrose (barra de escala 50µm).

D: Salmão (SA). O quadrado representa a região do enxerto, podemos observar o aumento da vascularização com diversos eritrócitos (setas) (barra de escala 100µm); **d:** É possível observar a presença de células de muco (setas curtas); eritrócitos (setas longas), monócitos (setas amarelas) e

linfócitos (setas vermelhas) nesta imagem podemos observar também uma área de necrose (barra de escala 20 μ m).

E: Animal Controle cirúrgico: O retângulo mostra à região que foi realizada a cirurgia (isenta de enxerto, apenas o corte), com a presença de alguns eritrócitos (setas) indicando um leve aumento da vascularização no local (barra de escala 20 μ m).

3ª Semana pós-enxerto

Figura 2: Histomicrografias de cortes transversais, 3ª semana pós-enxerto.

A: Truta Golden Doador (TGD). O quadrado representa a região do aumento (foto a) (barra de escala 100µm); **a:** é possível observar um processo inflamatório crônico, com a presença de monócitos (seta preta curta), eritrócitos (setas pretas longas), linfócitos (setas amarelas) e células de muco (setas brancas) (barra de escala 20µm).

B: Truta Golden Receptor Irmão (TGI). O quadrado representa a região do aumento (foto b), (barra de escala 100µm); **b:** Nota-se a presença de células de muco (setas pretas curtas); trombócitos (setas azuis); monócitos (setas pretas longas), linfócitos (setas amarelas) e cromatóforo (seta vermelha); podemos observar também uma região de necrose (barra de escala 20µm).

C: Truta Azul Receptor (TA). O quadrado representa a região do aumento (foto c), podemos observar a presença de cromatóforo (seta preta curta), centros de melanomacrófagos (setas pretas longas) e células de muco (seta amarela), (barra de escala 100µm); **c:** É possível observar a presença de células de muco (setas pretas curtas); eritrócitos (setas longas), linfócitos (seta amarela), monócitos (seta vermelha), centros de melanomacrófagos (setas azuis) e cromatóforo (setas verdes), (barra de escala 20µm).

D: Salmão (SA). O quadrado representa a região do aumento (foto d), (barra de escala 200µm), podemos observar um grande processo inflamatório crônico ao redor do enxerto (círculo); **d:** É possível observar a presença de células de muco (setas pretas curtas); eritrócitos (setas pretas longas), monócitos (setas azuis) e linfócitos (setas vermelhas) (barra de escala 20µm).

E: Animal Controle cirúrgico: É possível notar a presença de alguns eritrócitos (setas), (barra de escala 100µm).

5ª semana pós-enxerto

Figura 3: Histomicrografias de cortes transversais, 5ª semana pós-enxerto.

A: Truta Golden Doadora (TGD). O quadrado representa a região do aumento (foto a), é possível observar a gônada em formação. (barra de escala 200µm); **a:** é possível observar a maturação da gônada, com a presença de cistos de espermatídes em maturação (círculos amarelos), aumento da vascularização na região, com eritrócitos (seta preta), espermatozeugmata circundadas por células de Sertoli (seta vermelha); (barra de escala 20µm).

B: Truta Golden Receptor Irmã (TGI). O quadrado representa a região do aumento (foto b) nota-se um grande processo inflamatório crônico na região, (barra de escala 100µm); **b:** Nota-se a presença de células de muco (setas vermelhas); linfócitos (setas amarelas), trombócitos (seta verde), e eritrócitos (seta azul); (barra de escala 20µm).

C: Truta Azul Receptora (TA). O quadrado representa a região do aumento (foto c), podemos observar um processo inflamatório crônico em volta da região (barra de escala 200µm); **c:** É possível observar a presença de centros de melanomacrófagos (setas pretas), trombócitos (seta verde), linfócitos (seta amarela), monócitos (seta vermelha), (barra de escala 20µm).

D: Salmão (SA) É possível notar a presença de alguns linfócitos (seta preta) e eritrócitos (seta branca) na região (barra de escala 20µm),

E: Animal Controle cirúrgico: É possível notar a presença de alguns eritrócitos (setas), (barra de escala 50µm).

Os resultados obtidos no exame histopatológico sugerem a presença de um processo inflamatório agudo na primeira semana pós-enxerto, com o aumento visível de vascularização (eritrócitos) em torno do enxerto, há ainda uma grande expressão de células de muco. Machado (2015) sugere que o aparecimento de células de muco são as primeiras barreiras físicas do sistema imunológico de peixes.

Em uma segunda etapa (terceira semana) do processo inflamatório, os animais dos grupos TGI, TA e SA continuaram com uma inflamação e rejeição ao enxerto bem intensa, tornando-se crônico caracterizado pela presença de diversas células mononucleares (linfócitos, monócitos, trombócitos), atuantes na região, bem como células de muco. O início da rejeição é marcado por uma grande infiltração de células T, posteriormente os macrófagos e neutrófilos chegam para concluir o processo de rejeição (SHIBASAKI et al., 2010). Ainda no grupo TA foi possível visualizar a presença de diversos centros de melanomacrófagos, que são agrupamentos de monócitos contendo melanossomas entre os lisossomas, além de um acúmulo de ceroides e lipofuscina, auxiliares na destruição de antígenos (LINS et al; 2010).

Hitzfeld (2016) aponta que a presença dessas células no ambiente leva a fagocitose, produção de citotoxinas e consequente destruição do antígeno, no caso o enxerto.

No último período estudado (quinta semana), pudemos observar a redução de eritrócitos, e início da regeneração do tecido em todos os grupos, porém ainda existe uma grande concentração de células mononucleares como linfócitos e monócitos nos grupos TA e TGI.

No grupo TGD foi evidenciado nos 3 indivíduos replicatas, a maturação do testículo enxertado, com presença de espermatócitos, células de Sertoli, espermatozeugmata e diferenciação das espermátides sugerindo uma possível

aceitação da gônada enxertada pelos indivíduos. Quagio-Grassiotto et al (2013) sugere a presença de espermátides como indicativo do início de maturação da gônada.

Nos animais controles foi evidenciado apenas a presença de alguns eritrócitos na região do sarcolema do musculo esquelético. Genten et al (2009) mencionam que a presença destas células é comum em tecidos saudáveis.

No último estágio, no grupo SA, apenas um animal sobreviveu, não sendo possível avaliar se o enxerto foi então eliminado pelo receptor ou se não foi coletada a região correta, por ser de difícil visualização a presença do enxerto nesse estágio.

A aceitação da própria gônada no doador, gerando prole saudável, é um forte indício da ausência de resposta inflamatória no autoenxerto, conforme estudos de Cardwell; Sheffer Hedrick,(2001) que sugerem que quanto maior for distância genética entre o doador e receptor os enxertos podem ou não ser tolerados por mais tempo. Bhatta et al., 2012; Hayashi; Sakuma; Yoshizaki (2018) obtiveram respostas similares em estudos com truta-arco-íris e tilápia-do-Nilo, onde obtiveram espermatozoides viáveis em enxertos subcutâneos de tecido.

A repetição das análises de RTPCR, será necessária pois os resultados foram muito alterados, aparentando que os animais responderam de maneira individual, o que não está de acordo com os dados da histologia, tais resultados poderiam corroborar com a os resultados histopatológicos.

A realização de uma análise imuno-histoquímica seria de grande valia, mas apesar de nossos esforços, a escassez e pouca disponibilidade comercial dos mesmos, não permitiu a obtenção de anticorpos específicos para os linfócitos, monócitos e outros leucócitos pertinentes, além de anticorpos específicos para MHC classe I e II para a realização dessas análises neste trabalho.

Capítulo III

Transplante de células germinativas

Resposta imunológica observada em transplante isógenos, alógenos, e xenógenos de células germinativas em testículo, em salmonídeos

Introdução

Durante o desenvolvimento embrionário, existe uma pequena população de células isoladas, chamadas células germinativas, que dão origem aos espermatozoides e ovócitos. (WYLIE, 1999)

O imunoprivilegio é uma característica evolutiva para proteger tecidos com capacidade limitada de regeneração e perda de função. Portanto, mesmo depois de um grande dano, o testículo pode manter a capacidade reprodutiva de um indivíduo (MADDOCKS; SETCHELL, 1990).

Células germinativas podem ser transplantadas entre diferentes espécies, permitindo a produção de gametas alógenos derivados do doador (TAJIMA et al., 1993; BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994). Ainda que estas 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).

O transplante de células germinativas já foi realizado em diversas espécies de mamíferos e aves, sendo uma ferramenta reprodutiva para produção animal ou método para restauração de fertilidade importante atualmente. (BUEHR et al., 1993; HONARAMOOZ; MEGEE; DOBRINSKI, 2002; KANATSU-SHINOHARA et al., 2003; KANG et al., 2008; HERRID et al., 2009).

Os primeiros transplantes em peixes foram realizados 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); podendo ser realizados também nos primeiros estágios embrionários (SAITO et al., 2008). A partir de então, outras espécies de peixes foram 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).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imunológica envolvida em transplantes alogênicos, isogênico, e xenogênico de célula germinativa em salmonídeos, este trabalho visa ser uma possível ferramenta para a melhoria da técnica de barriga de aluguel.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 40 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) machos, de 1 ano e (peso médio de 300 g e comprimento padrão médio de 250 cm) e 10 salmões do Atlântico (*Salmo salar*) machos, de 1 ano (peso médio de 250 g e comprimento padrão médio de 150 cm), que foram submetidos a transplantes alogênicos, xenogênicos, isogênico e autogênicos, conforme esquema abaixo, na *Estação Experimental de Salmonicultura “Ascânio de Faria”*, situada em Campos do Jordão – SP, administrada pela APTA (Agência Paulista de Tecnologia e Agronegócios). Todos os procedimentos realizados estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP, certificado nº 1331130716.

Indução de triploidia por choque térmico

Para serem utilizados como recipientes foram gerados animais triploides, visto que estes são geralmente estéreis, a partir de choque térmico usando ovócitos de truta arco-íris das linhagens Jordanense (JJ) ou Shasta (SS) e sêmen de macho da linhagem Golden (GG). Após a fertilização artificial, os ovos fertilizados foram incubados a 10°C por 10 minutos e em seguida transferidos imediatamente e submetidos a um choque térmico a 28°C por 20 minutos para evitar a liberação do corpúsculo polar. Os ovos embrionados foram mantidos em gavetas de incubação com sistema aberto e a uma temperatura que variava entre 9 e 13°C. A triploidia foi verificada por observação direta do padrão de cores de larvas recém-eclodidas que nos híbridos adquire a cor parda e também pela medição dos diâmetros maior e menor das hemácias preparadas pela técnica de esfregaço.

Histopatológico

As amostras de tecidos foram coletadas das regiões enxertadas nos 7°, 14°, 21° e 35° dias pós-enxerto.

O material foi fixado em paraformaldeído 4% por 48 horas, sendo então fixado em álcool 70% para posterior inclusão em parafina, esta feita com banhos crescentes de álcool, 70, 90 e 100% (4 horas cada), 3 banhos de Xilol (3 horas cada), 2 banhos em parafina (3 horas cada) e finalmente, inclusão do material utilizando formas apropriadas.

Os cortes histológicos de parafina foram realizados com 3µm de espessura e submetidos a desparafinização com 3 banhos de Xilol (10 minutos cada), reidratação em banhos de soluções alcoólicas decrescentes, 100, 90 e 70% (20 minutos cada) e então realizamos a com Hematoxilina por 1 minuto, lavadas em água corrente durante 2 minutos e coradas com Eosina por 2 minutos.

Para realização das análises histopatológicas foi utilizado o Microscópio Olympus bx60, (FMVZ-USP, São Paulo – Brasil).

O enxerto

Os Salmões doadores foram anestesiados em solução de Benzocaína (proporção de 1:10000), por aproximadamente 2 minutos, e então retirados da água e colocados em suporte, na posição de decúbito dorsal, e foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Foi realizada uma incisão na parte ventral, onde o testículo esquerdo foi excisado na região anterior e posterior, sendo retirado totalmente. As brânquias dos animais foram irrigadas constantemente com uma pipeta com água para a manutenção da vida dos mesmos. Após o procedimento, foi realizada uma sutura utilizando fio de seda 3-0, e os animais voltaram a água corrente para recuperação.

As gônadas foram submetidas a tratamento, onde Foi realizado um “pool” das células germinativas, preparadas conforme protocolo abaixo.

Os animais que receberam o transplante das células germinativas dos doadores foram submetidos à solução de Benzocaína (0.0005%) por aproximadamente 3 minutos, então, retirados da água e colocados no suporte, na posição de decúbito ventral. Foi realizada uma incisão ventral, as células dos animais doadores foram inseridas nos testículos dos receptores com auxílio de uma seringa de insulina. A todo o momento, as brânquias foram irrigadas com pipetas com água para manutenção dos animais. Após o procedimento, foi realizada uma sutura e os animais voltaram a água corrente, para recuperação.

Os animais controle cirúrgico foram operados conforme os receptores, e receberam apenas azul de metileno em sua gônada para controle da reação.

Preparo das células germinativas

Gônadas de 10 machos juvenis de salmão do Atlântico de um ano de idade foram dissecadas, seccionadas e então submetidas a um tratamento enzimático com solução de tripsina 0.125%, DNase e FBS em tampão PBS por 2 horas a 20°C. Após 3 lavagens com MEM-5, a solução foi filtrada numa malha de 45µm e coradas com PKH-26 (Sigma) por 5 minutos, de acordo com as instruções do fabricante. As células com diâmetro entre 10 e 20 µm foram contadas usando o hematócrito Improved Double Neubauer Ruling (Resistance, Germany).

RTPCR

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 TRIzol™ 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.

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 primers	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

Análise estatística

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 $p < 0,05$.

Resultados

Nos resultados obtidos, ao segundo dia pós transplante, pudemos observar a presença de eritrócitos em todos os animais transplantados (Figura 4 B, C e D), no salmão há também a presença de cistos de espermatogônia, espermatíde, espermatócitos primários e espermatozoides (Figura 4 C). Não há indícios de hemorragia no controle branco (Figura 4 A).

Na sétima semana pós transplante é possível observar a presença de alguns linfócitos e eritrócitos no grupo controle cirúrgico (Figura 5 B), no grupo salmão existe a presença de espermatozoides (Figura 5 C) e no grupo truta receptora, linfócitos, eritrócitos, espermatozoides e espermatídes são existentes (Figura 5 D).

Aos 23 dias pós transplante não se notam células do sistema imunológico em ambos os controles e no salmão (Figura 6 A, B e C), este último com a presença de diversos espermatozoides, o grupo truta receptora há presença de poucos linfócitos e de alguns sítios com espermatócitos primários (Figura 6 D).

Aos 60 dias pós transplante pode-se observar grande quantidade de espermatozoides no grupo salmão (Figura 7C e Figura 8), alguns no grupo truta receptora (Figura 7D), este último também com a presença de espermatócitos primários.

2 dias pós transplante

Figura 4: Histomicrografias de cortes transversais da gônada, 2 dias pós-enxerto.

A: Truta Controle Branco (TCB). (barra de escala 20µm).

B: Truta Controle Cirúrgico (TCC). Presença de eritrócitos (seta vermelha); (barra de escala 20µm).

C: Salmão (SA). Presença de eritrócitos (seta vermelha), espermatozoides (seta verde),espermátócitos primários (seta laranja), espermátide (seta preta) e cistos de espermatogônia tipo B (seta amarela); (barra de escala 20µm).

D: Truta receptora (TR), Presença de eritrócitos (seta vermelha); (barra de escala 20µm).

7 dias pós transplante

Figura 5: Histomicrografias de cortes transversais da gônada, 1ª semana pós-enxerto.

A: Truta Controle Branco (TCB). (barra de escala 20µm).

B: Truta Controle Cirúrgico (TCC). Presença de eritrócitos (seta vermelha), e linfócitos (seta azul); (barra de escala 20µm).

C: Salmão (SA). Presença de espermatozoides (seta verde); (barra de escala 20µm).

D: Truta receptora (TR) Presença de eritrócitos (seta vermelha), espermatozoides (seta verde), linfócitos (seta azul) e espermatíde (seta preta); (barra de escala 20µm).

23 dias pós transplante

Figura 6: Histomicrografias de cortes transversais da gônada, 3ª semana pós-enxerto.

A: Truta Controle Branco (TCB). (barra de escala 20µm).

B: Truta Controle Cirúrgico (TCC). (barra de escala 20µm).

C: Salmão (SA). Presença de espermatozoide (setas verdes);(barra de escala 50µm).

D: Truta receptora (TR). Presença de linfócito (seta azul) e espermatócitos primários (seta laranja); (barra de escala 20µm).

60 dias pós transplante

Figura 7: Histomicrografias de cortes transversais da gônada, 9ª semana pós-enxerto.

A: Truta Controle Branco (TCB). (barra de escala 20µm).

B: Truta Controle Cirúrgico (TCC). (barra de escala 20µm).

C: Salmão (SA). Presença de espermatozoides (seta verde); (barra de escala 20µm).

D: Truta receptora (TR) Presença de espermatozoides (seta verde) e espermatócitos primários (seta laranja); (barra de escala 20µm).

Figura 8: Histomicrografias de cortes transversais da gônada de salmão, 60 dias pós enxerto, onde é possível ver os espermatozoides (setas verdes) (barra de escala 100μm)

Os resultados do RTPCR não deram conclusivos estatisticamente, ficando inviável a publicação desde nesse momento, as análises serão refeitas.

Os resultados obtidos mostraram que a resposta imunológica ao transplante de células germinativas no testículo é realmente baixa, podendo ser devido à condição do órgão imunoprivilegiado, onde antígenos estranhos seriam tolerados (KAUR; MITAL; DUFOUR, 2013; LI; WANG; HAN, 2016; STEIN-STREILEIN; CASPI, 2014). A gametogênese depende da compatibilidade dos animais doador-receptor (KAGAWA, 2013). A aceitação do grupo salmão das células germinativas enxertadas, e sua gametogênese, indica que isoenxertos é uma técnica viável e eficaz, em nosso estudo, todos os animais do grupo salmão receptor obtiveram espermatozoides viáveis oriundos das células do transplante.

Apenas 10 dos 40 animais do grupo truta receptora desenvolveram a gametogênese das células transplantadas, formando espermatozoides viáveis, o que indica a baixa taxa de aceitação em enxertos alogênicos, porém, esta capacidade de aceitar células transplantadas de diferentes espécies permite o sucesso do transplante alogênico e xenogênico em algumas espécies (BRINSTER; ZIMMERMANN, 1994).

Não houve uma resposta imunológica expressiva no transplante de células germinativas, sendo visível apenas alguns linfócitos e eritrócitos em nossas amostras; A presença de linfócitos nos testículos já foi vista por Uribe et al, 2014.

A baixa taxa de gametogênese no transplante alogênico já é citada em diversos trabalhos (OKUTSU et al., 2006; MAJHI et al., 2009; MORITA et al., 2012; FARLORA et al., 2014), sendo fundamental um estudo mais aprofundado para avaliar possíveis métodos que possam reverter essa realidade.

As análises de RTPCR não obtiveram resultado satisfatório nesse estudo, as taxas dos genes analisados (CD4, CD8, IL2 e MHC classe II) se mostraram muito baixas, onde ficou estatisticamente inviável a conclusão do estudo, sendo estas taxas menores

talvez, pela baixa resposta imunológica obtida no testículo, fato que corrobora com as análises histológicas obtidas.

Considerações Finais

Com este trabalho pudemos constatar que o tanto o transplante de tecido gonadal, subcutâneo quanto o transplante de células germinativas no testículo do animal receptor são técnicas viáveis de acordo com a proximidade genética do doador-receptor.

A taxa aceitação e gametogênese de autoenxerto e isoenxerto são elevadas, e ambas as técnicas, são, portanto, eficazes.

Já enxertos subcutâneos alogênicos e xenogênicos possuem baixa taxa de aceitação, sendo praticamente inviável, pois possuiu alta resposta imunológica e destruição do testículo enxertado, e até óbito de alguns animais.

A técnica de transplantes de células germinativas foi mais bem-sucedida, visto o imunoprivilégio do testículo, bem aceita em isoenxerto e aloenxerto, e apesar de não haver resposta imunológica em alta escala, poucos indivíduos xenogênicos obtiveram sucesso na gametogênese, sendo esta técnica a mais eficaz, porém ainda sendo necessários estudos para o aumento da taxa de aceitação por parte do receptor.

Deve-se buscar novas abordagens para tentar minimizar a rejeição dos enxertos, visando a melhoria da efetividade da técnica de barriga de aluguel.

Referências

- ADAMS DH, HUTCHINSON IV. Microchimerism and graft tolerance: cause or effect? *Lancet*.;349(9062):1336-7. 1997
- ABBAS, ABUL K., ANDREW HH LICHTMAN, AND SHIV PILLAI. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier Brasil, 2015.
- 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.
- 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
- 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. 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.
- CHAO NH, LIAO IC. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos.; 197: 161–189. *Aquaculture* 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. 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.
- GENTEN, FRANCK. **Atlas of fish histology**/Franck Genten, Eddy Terwinghe, Andri Danguy. p. cm. 2009
- 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.

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.

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.

HILDEMAN, W. H. Tissue Transplantation Immunity in Goldfish. **Immunology**, v. 1, n. 1, p. 46, 1958.

HITZFELD, BETTINA. Fish Immune System. **Encyclopedia of Immunotoxicology**, p. 319–323, 2016.

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.

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.

LAWRENCE, PETER A., MICHAEL ASHBURNER, AND PAUL JOHNSTON. "An attempt to hybridize Drosophila species using pole cell transplantation." 1145-1148. *Genetics* 134.4 (1993)

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.

LINS, J. A. P. N. et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad. Ciên. Agrár. Ambient**, v. 8, p. 469-484, 2010.

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.

MACHADO, MARCELO RUBENS. "Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas." **Journal of Health Sciences** 1.1 (2015).

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.

MAGALHÃES, P. S. C., MARISTELA BÖHLKE, AND FERNANDO NEUBARTH. "Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas." **Rev. Med. UCPEL (Pelotas)** 2.5 59 (2004)

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.

MANNING, M. J., AND T. NAKANISHI. The specific immune system: cellular defenses. In *The Fish Immune System*. G. Iwama and T. Nakanishi, eds. Academic Press, San Diego, p. 159. 1996.

MIES, Sergio et al. Transplantes hepáticos. **Einstein**, v. 3, p. 13-20, 2005.

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 51 (*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.

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

OKUTSU T, YANO A, NAGASAWA K, SHIKINA S, KOBAYASHI T, TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G. Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation.; 52: 685–693. **J. Reprod. Dev.** 2006

ONO, TAMAO, RYOHEI YOKOI, AND HIROHIKO AOYAMA. "Transfer of male or female primordial germ cells of quail into chick embryonic gonads." 347-352. *Experimental Animals* 45.4 . 1996

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.

QUAGIO-GRASSIOTO, I.; WILDNER, D. D.; ISHIBA, Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 181-191, 2013.

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.

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 ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 10, p. 1075–1081, out. 2010.

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.

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.

STARZL TE, DEMETRIS AJ, MURASE N et al. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet*;339(8809):1579-82. . 1992

STEIN-STREILEIN, J.; CASPI, R. R. Immune privilege and the philosophy of immunology. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. MAR, p. 2–3, 2014.

STET, R. J. M., B. DIXON, S. H. M. VAN ERP, M. C. VAN LIEROP, P. N. S. RODRIGUES, AND E. EGBERTS.. Inference of structure and function of fish major histocompatibility complex (MHC) molecules from expressed genes. **Fish Shellfish Immunol.** 6:305. 1996

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. Surrogate broodstock produces salmonids.; 430: 629; **Nature** 2004

TSUKAMOTO, K., KAWAMURA, T., TAKEUCHI, T., BEARD JR, T. D., & KAISER, M. J. Spermatogonial transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents. **Fisheries for Global Welfare and Environment**, 209. (2008).

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.

U.S. Fish & Wildlife Service. USFWS Threatened and Endangered Species System. http://ecos.fws.gov/tess_public/StartTESS.do (*assessed in February 2015*)

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.

WORM B, BARBIER EB, BEAUMONT N, DUFFY JE, FOLKE C, HALPERN BS, JACKSON JB, LOTZE HK, MICHELI F, PALUMBI SR, SALA E, SELKOE KA, STACHOWICZ JJ, WATSON R. **Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem service.**; 314: 787–790. **Science** 2006

WYLIE, C. Germ cells. **Cell**, v. 96, p. 165–174, 1999.

YOSHIZAKI G, TAKEUCHI Y, KOBAYASHI T, IHARA S, TAKEUCHI T. Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. 26: 3–12. **Fish Physiol. Biochem.** 2002;