

MARCEL HENRIQUE BLANK

**Conservação de germoplasma de cracídeos ameaçados por meio de
transplantes interespecíficos de células germinativas**

São Paulo
2020



MARCEL HENRIQUE BLANK

**Conservação de germoplasma de cracídeos ameaçados por meio de
transplantes interespecíficos de células germinativas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

São Paulo

2020

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. 3893 FMVZ	Blank, Marcel Henrique Conservação de germoplasma de cracídeos ameaçados por meio de transplantes interspecíficos de células germinativas / Marcel Henrique Blank. – 2020. 142 f. : il.
	Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.
	Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
	Área de concentração: Reprodução Animal.
	Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira.
	1. Quimioterapia. 2. Célula-tronco espermatozoal. 3. Xenotransplante. 4. Testículo. 5. Aves. I. Título.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CRACÍDEOS AMEAÇADOS POR MEIO DETRANSPLANTES INTERESPECÍFICOS DE CÉLULAS GERMINATIVAS", protocolada sob o CEUA nº 3684090418 (ID 006687), sob a responsabilidade de **Ricardo José Garcia Pereira e equipe; Marcel Henrique Blank** - 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 26/06/2019.

We certify that the proposal "CONSERVATION OF THE ENDANGERED CURASSOWS THROUGH INTERSPECIFIC GERM CELL TRANSPLANTATION", utilizing 60 Birds (60 males), protocol number CEUA 3684090418 (ID 006687), under the responsibility of **Ricardo José Garcia Pereira and team; Marcel Henrique Blank** - 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 06/26/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2018** a **07/2019**

Área: **Reprodução de Aves**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos**

idade: **11 a 60 semanas** N: **60**

Linhagem: **White Hyssex**

Peso: **450 a 2200 g**

Local do experimento: Com exceção da etapa de obtenção das gônadas de cracídeos que serão realizados em instituições colaboradoras, todas as etapas dos experimentos serão conduzidos no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ □ USP) campus - São Paulo-SP.

São Paulo, 10 de outubro de 2019

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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BLANK, Marcel Henrique

Título: Conservação de germoplasma de cracídeo ameaçados por meio de transplantes interespecíficos de células germinativas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

“It seems to me that the natural world is the greatest source of excitement; the greatest source of visual beauty; the greatest source of intellectual interest. It is the greatest source of so much in life that makes life worth living”

(David Attenborough)

Este trabalho é dedicado à

Minha Mãe, Clarice

Meus Irmãos,

Meus Mestres

E,

Minha Ana

“If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk the crawl, but whatever you do you have to keep moving forward.”

(Martin Luther King Jr.)

AGRADECIMENTOS

Metamorfose. Esses quatro anos são definidos por essa palavra. Nunca imaginei morar ou passar por aqui, mas agora sou grato a tudo que São Paulo me proporcionou. Foram quatro anos de distância, ausência e muita saudade, mas apesar disso, o amor sempre fez parte do meu dia a dia.

Amor. Palavra que ilumina, aquece e dá valor a vida de qualquer um e, apesar da distância, sei que foi transmitida todos os dias até mim, pela minha família e por aqueles que me abraçaram.

*Por esta razão, agradeço ao Amor incondicional da minha **família**. Foi muito difícil ficar longe de vocês, porém, isso só aconteceu porque sempre me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos! **Mãe**, obrigado por ser a melhor professora do mundo, pois me ensinou a ser uma pessoa cada vez melhor. Se cheguei onde estou, devo isso a senhora e ao seu amor incondicional. **Irmã**, agora mamãe da **Lívia**, fico triste em não ter acompanhado essa fase da sua vida, porém feliz em ver que você realizou seu sonho de ser mamãe. Obrigado irmã, por sempre acreditar nos meus sonhos! Meus **irmãos**, obrigado por me persuadir a sofrer com o São Paulo FC! Assim, aprendi que a vida não é feita apenas de vitórias e que derrotas, também constroem nosso caminho.*

*Durante esses quatro anos de doutorado muitas conquistas e surpresas ocorreram, porém, foi neste último ano que algo realmente especial aconteceu. Tudo foi tão rápido e intenso que hoje não me vejo longe de você, obrigado **ANA CLARA** por compartilhar seu amor comigo, **TE AMO**. Não obstante, agradeço a sua mãe **Claudia** e a sua irmã **Natália**.*

*Apesar de todo meu esforço e estudo, este trabalho nunca seria realizado sem meu orientador e amigo, **Professor Ricardo**. Professor, muito obrigado pela oportunidade. Sou muito grato por todos os debates e ensinamentos que me proporcionaram aprendizado!*

*Entre os papers, as aulas e as atividades de laboratório, vocês sempre estiveram ao meu lado. Sem vocês, meus amigos, eu não teria desenvolvido esse trabalho! **Brunão, Daniel, Diego, Andressa, Gabriel, Rapha, Mônica e Bobbie**, muito obrigado pela irrestrita ajuda, conselhos e amizade!*

*Gostaria de agradecer a morada dos pássaros, pelo acolhimento nos meus primeiros anos em São Paulo. Com esse nome tive a certeza que tudo daria certo. E também, por ter conhecido pessoas tão maravilhosas que levarei para toda a vida. **Thiago, Pedro, Gustavo, Erivelton, Esdras, Marilady, Gizele, Hadassa e Léo**, muito obrigado pela Amizade!*

*Professor **Marcílio** (Marcilião), meu amigo, parceiro do pôquer e dos quitutes. Obrigado por todos os ensinamentos, principalmente na estatística, e também por compartilhar sua generosidade e humildade!*

*Agradeço a estrutura que possibilitou tudo isso: o VRA e seus professores (**André, Anneliese, Camila, Clair, Claudia, Claudio, Ed Hoffmann, Eneiva, Guilherme, Mário, Mayra, Pietro, Rubens, Visintin**). Além disso, agradeço aos demais funcionários (**Claudia, Camila, Priscila, Loide, Roberta, Harumi, Fernando, Miguel, Thais, Luiz, Ira, Belau, Dona Sandra e Joci**).*

*Em especial, agradeço ao departamento de Patologia e Anatomia da FMVZ-USP. Ao professor **Bruno Cogliati**, pelo suporte na imunohistoquímica, e ao Professor **Marcelo Goissis**, pela ajuda no PCR.*

*Agradeço à **Universidade de São Paulo**, à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** que possibilitou este doutorado e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela bolsa de ensino concedida.*

Por fim, é natural da humanidade agradecer o que lhe é aprazível ou vantajoso, difícil de modo racional canonizar uma ação que virtualmente o desagrada. Assim, gostaria de exaltar os efêmeros que, mesmo sem querer, contribuíram em minha construção pessoal e profissional, parafraseando “Gibran”, deixo aqui meu agradecimento a todos vocês que não foram

mencionados nessas linhas: “Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a bondade com os maldosos; e, por mais estranho que pareça, sou grato a esses professores.” - Khalil Gibran.

RESUMO

BLANK, M. H. **Conservação de germoplasma de cracídeos ameaçados por meio de transplantes interespecíficos de células germinativas** [Conservation of the endangered curassows through interespecific germ cell transplantation]. 2020. 142 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Na área da biologia da conservação, a capacidade de criopreservar e reviver espécies raras e ameaçadas é fundamental para a preservação da diversidade genética. Neste sentido, uma abordagem inovadora é utilizar animais hospedeiros estéreis ou parcialmente estéreis para o transplante de células germinativas. Essa tecnologia já foi utilizada anteriormente em mamíferos, porém é de particular importância para aves cuja criopreservação de espermatozoides, oócitos e embriões são ineficientes devido à alta susceptibilidade ao congelamento e a grande quantidade de vitelo. Contudo, a recuperação eficiente do genótipo do doador e a transmissão da linha germinativa a partir dos animais hospedeiros ainda são áreas que precisam ser mais aprofundadas. Dessa forma, nosso grupo de pesquisa vem estudando um método simples, barato e seguro para suprimir a espermatogênese endógena em pintos recém-nascidos através do uso de doses fracionadas de bussulfano. Portanto, foi possível demonstrar através do ganho de peso, consumo de ração, hematócrito, dosagem hormonal, coleta de sêmen, histologia testicular, imunofluorescência, imunohistoquímica e genética que injeções repetidas (20 mg /kg ou levemente superior) de bussulfano podem ser utilizadas na supressão da espermatogênese endógena e, podem ser empregadas com sucesso no transplante xenogênico de SSC em espécies de aves. Embora testes de progênie não ainda não tenham sido realizados, nossos resultados também indicam que, após esse regime de quimioterapia, algumas células germinativas oriundas de cracídeos foram capazes de sobreviver a manipulação e congelamento e se mantiveram viáveis por até 120 dias após o transplante xenogênico em galos domésticos

Palavras-chave: Quimioterapia, célula-tronco espermatogonial, xenotransplante, testículo, aves

ABSTRACT

BLANK, M. H. **Conservation of the endangered curassows through interespecific germ cell transplantation** [Conservação de germoplasma de cracídeos ameaçados por meio de transplantes interespecíficos de células germinativas]. 2020. 142 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

In the field of conservation biology, the ability to freeze and revive rare and threatened species is critical for the preservation of genetic diversity. In this regard, an innovative approach is to use sterile or partially sterile host animals for germ cell transplantation. This technology has been used previously in mammals, but is of particular importance for birds whose cryopreservation of sperm, oocytes and embryos are inefficient due to their high susceptibility to freezing and large amount of yolk. However, the efficient recovery of donor genotype and germline transmission to host animals are areas that still need to be further addressed. Thus, our research group has been developing a simple, inexpensive and safe method to suppress endogenous spermatogenesis in newly hatched chicks by using fractionated doses of busulfan. Our findings demonstrated through survival, body weight, feed intake, hematocrit test, testosterone measurement, semen analysis, testicular histology, immunofluorescence, immunohistochemistry and molecular analysis that fractionated administration of busulfan (20 mg / kg or slightly higher) can be employed to suppress endogenous spermatogenesis in newly hatched chicks, and can be successfully applied in xenogeneic SSC transplantation in birds. Although progeny tests have not yet been performed, our data also indicate that following this chemotherapy regimen curassow germ cells were capable of withstanding processing and cryopreservation, and remained viable for up to 120 days after xenogeneic transplantation to chicken recipients.

Keywords: Chemothepary, spermatogonial stem cells, xenotransplantation, testis, avian

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema resumido sobre a distribuição das células germinativas primordiais (pgcs) em embriões de galinha a partir do início da pré-gastrulação (a, estágio x – egk) até a fase medial da gastrulação (d, estágio 3 hh) e suas respectivas secções (e-h). todos os esquemas mostram a visão ventral dos embriões. a (e): embriões em estágio x com ppgcs espalhadas na região central da camada do epiblasto. b (f): embrião em estágio xii, com a crescente camada de hipoblasto, e os ppgcs ainda no epiblasto. c (g): embrião do estágio xiii, com o hipoblasto totalmente expandido, que hospeda as ppgcs que caem do epiblasto. d (h): estágio 3 hh (linha pré-primitiva), as ppgcs são deslocadas junto com o hipoblasto em direção à crescente germinativa. 29

Figura 2 – Representação gráfica do nicho testicular espermatogonial. gdnf – fator neurotrófico derivado da glia; bfgf – fator de crescimento fibroblástico básico; csf1 – fator estimulador de colônias 1; vegf – fator de crescimento endotelial vascular; igf1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; le cell – célula endotelial linfática intersticial; pm cell - células mióides peritubulares; ssc - célula-tronco espermatogonial com capacidade de auto renovação. 36

Figura 3 - Progressão semanal do (a) peso corporal e (b) consumo de ração de pintos de um dia de idade tratados com doses fracionadas de bussulfano durante as primeiras cinco semanas de vida. (c) efeitos do tratamento com bussulfano no hematócrito de pintos de 6 semanas após quimioterapia. asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (com $p < 0,05$). injeção de veículo (ve - n, n-dimetilformamida + água destilada), injeções de bussulfano nas concentrações de 10, 20 e 40 mg / kg (grupos bu10, bu20 e bu40, respectivamente). 58

Figura 4 - (a) níveis plasmáticos de testosterona e (b) produção de esperma de galos tratados com doses fracionadas de bussulfano durante as primeiras cinco semanas de vida. os dados são relatados como média \pm erro-padrão. galos submetidos à dose mais elevada de bussulfano (bu40) não conseguiram produzir espermatozoides entre 18 a 30 semanas de idade. asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (con – $p < 0,05$). injeção de veículo (ve - n, n-dimetilformamida + água destilada), injeções de bussulfano nas concentrações de 10, 20 e 40 mg / kg (grupos bu10, bu20 e bu40, respectivamente). 60

Figura 5 - Índice gonadosomático (gsi) de pintos tratados com doses fracionadas de bussulfano durante as primeiras cinco semanas de vida. (a e b) valores médios de gsi (\pm ep) de indivíduos de diferentes grupos às 6 e 30 semanas de idade, respectivamente. (c)

comparação macroscópica de testículos de galos dos grupos controle (con), veículo (ve - n, n-dimetilformamida + água destilada) e bussulfano (bu10, bu20 e bu40) às 6 e 30 semanas de idade. asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (con - $p < 0,05$). as barras de escala representam 1 cm. 62

Figura 6 - Análise histológica do parênquima testicular em pintos controle e tratados com bussulfano. (a) micrografias das secções testiculares de pintos de 6 semanas nos grupos controle (con) e tratados com veículo (ve) e bussulfano (bu10, bu20 e bu40 correspondem a doses de 10, 20 e 40 mg / kg) (h&e 200x; inserções 400x). (b) e (c) diâmetro tubular seminífero médio (\pm ep) e escore nos grupos experimentais às 6 e 30 semanas de idade, respectivamente. (d) micrografias das seções de testículos de galos de 30 semanas nos grupos controle, veículo e tratados com bussulfano (h&e 200x; insets 400x). asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (con - $p < 0,05$). as barras de escala representam 50 μ m (20 μ m em inserções). 64

Figura 7 - Análise das criosecções coradas por imunofluorescência com anti-soro anti-cnanog utilizando embriões de galinha no estágio egk-x (embriões coletados de ovos recém ovipostos) e gônadas primordiais de embriões com 5,5 dias (estágio 25 hh). as linhas tracejadas (pretas) indicam o sentido do corte, enquanto as vermelhas indicam a posição das gônadas primordiais. as barras de escala representam 500 μ m. 66

Figura 8 - Criossecções coradas por imunofluorescência do parênquima testicular de pintos controle e tratados com bussulfano usando anti-soro anti-cnanog. (a - c) expressão de cnanog em núcleos de algumas células em embriões de galinha egk estágio x (st. x - usado como controle positivo). (d - g) seções de testículos de pintos de 6 semanas dos grupos controle e veículo (con e ve, respectivamente) mostrando expressão citoplasmática de cnanog em muitas células germinativas. (j - l) redução acentuada de células germinativas que expressam cnanog nos testículos de pintos tratados com bussulfano a 10 mg / kg (bu10). (m - o) pouquíssimas células expressaram cnanog em seções testiculares de pintos tratados com bussulfano a 20 mg / kg (bu20). (p - r) não foi detectada expressão de cnanog em pintos tratados com bussulfano a 40 mg / kg (bu40). as setas brancas representam células que expressam cnanog. cada barra de escala indica 50 μ m. 67

Figura 9 - Expressão relativa de mrna de genes para pluripotência (ch-c-myc), células germinativas primordiais (ch-nanog), células-tronco espermatogonais (ch-gfr α 1), apoptose (ch-bid) e anti-apoptose (ch-bcl-2) em testículos de pintos de 6 semanas tratados com doses fracionadas de bussulfano. os valores (a) são expressos como unidades arbitrárias de mrna ch-c-myc, ch-ch-gfr α 1 e nanog normalizados contra os níveis de

expressão de gapdh amplificados a partir do mesmo molde, em relação à expressão observada em controles. (b) os valores são expressos como unidades arbitrárias de mrna de ch-bid e ch-bcl-2 normalizadas contra os níveis de expressão de gapdh amplificados a partir do mesmo molde, em relação à expressão observada nos controles. asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (con - p <0,05). injeção de veículo (ve - n, n-dimetilformamida + água destilada), injeções de bussulfano nas concentrações de 10, 20 e 40 mg / kg (grupos bu10, bu20 e bu40, respectivamente). 69

Figura 10 - Secções coradas por imunohistoquímica do parênquima testicular de codorna e galos controle e transplantados com espermatogônias de codorna usando anti-soro anti-qcpn. (a) expressão de qcpn em núcleos de células testiculares de codorna. (b)secção de testículo de galo transplantado com espermatogonias de codorna mostrando a expressão nuclear de qcpn tanto em células germinativas quanto em células somáticas. (c) secção de testículo de galo controle (não transplantado) mostrando a completa ausência de expressão de qcpn. cada barra de escala indica 50 µm. 70

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente da ovalbumina de codorna através de nested pcr. (a) peso molecular com escala de 100 pb. (b-h) amostras seriadas com dna de codorna e galo (100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001% de dna de codorna e 100% de dna de galo respectivamente). (i) controle negativo com h₂o. a seta indica a posição dos amplicons internos (181 pb). 71

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente da ovalbumina de codorna (inner modificado) através de nested pcr. (a) peso molecular com escala de 100 pb. (b e c) amostras de dna de galo; (d – i) amostras de dna de codorna; (j e k) controle negativo com h₂o. a seta indica a posição dos amplicons internos (181 pb). 71

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do dna mitocondrial de codorna através de nested pcr. (a) peso molecular com escala de 100 pb. (b - h) amostras seriadas com dna de codorna (100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001%) e dna de galo; (i) amostra de dna de galo; (j e k) controle negativo com h₂o. a seta indica a posição dos amplicons internos (134 pb). 72

Figura 14 - Cronograma do projeto experimental. para realizar a depleção das células germinativas endógenas dos receptores, pintinhos (n = 32) de um dia de vida foram alojados no biotério experimental de aves (a) antes de serem submetidos a injeções repetidas intraperitonealmente de 30 mg/kg de bussulfano por 5 semanas (b-f). cinco

semanas após o término do tratamento quimioterápico, as aves receptoras receberam células germinativas de cracídeos marcadas com pkh26 através de injeções intratesticulares (g-h). para avaliar o desenvolvimento (proliferação e diferenciação) d\ células germinativas transplantadas, os testículos foram coletados em períodos de tempo específicos (g-o; de 0 hora a 150 dias) e processados para análise de imunofluorescência e genética (pcr). 85

Figura 15 – (a) taxa de viabilidade celular em relação ao tempo total desde a morte da aves até o processamento do material no laboratório. (b) taxa de viabilidade celular das amostras utilizadas no transplante antes e após a criopreservação. (c) total de células recuperadas por peso testicular. asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos $p < 0.05$. 94

Figura 16 - Avaliação microscópica dos testículos de galo imediatamente (0 hora) e 24 horas após o transplante de células testiculares de cracídeos. células marcadas foram encontradas na região intersticial do tecido, próximo a lesões teciduais causadas pelas injeções. setas brancas indicam células testiculares marcadas. as barras de escala representam 50 μm . 96

Figura 17 – Avaliação microscópica do testículo de galos 7 e 21 dias após o transplante de células testiculares de cracídeos. aos 7 dias observamos a reestruturação do tecido testicular com a formação de alguns túbulos seminíferos, mas ainda apresentado lesões causadas pela injeção. aos 21 dias observamos uma maior reestruturação do tecido com uma diminuição a área lesada pela injeção. as setas brancas indicam células testiculares marcadas, as linhas tracejadas delimitam o lúmen tubular (*). as barras de escala representam 50 μm . 97

Figura 18 - Avaliação microscópica do testículo de galos 42 dias após o transplante de células testiculares de cracídeos. aos 42 dias observamos a quase completa reestruturação do tecido testicular. as setas brancas indicam células testiculares marcadas, as linhas tracejadas delimitam o lúmen tubular (*). as imagens inferiores representam inserções dos quadros superiores, indicando com maior detalhe o posicionamento das células testiculares no túbulo seminífero. as barras de escala representam 50 μm . 98

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para c. alector e c. fasciolata através de nested pcr. (a) peso molecular com escala de 100 pb; dna de galos receptores, (b) amostra do tempo 0 e (c-f) 24 horas após o transplante. (g e h) amostras de controles positivos com dna de crax alector e crax fasciolata, respectivamente. (i) amostras controle negativo com dna de galo não transplantado. (j) controle negativo com H_2O . as setas indicam a posição dos amplicons

externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). todos os testículos receptores (b-f) mostraram a presença de material genético de cracídeo, porém as bandas de amplicons (externo) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas. 99

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para *C. alector* e *C. fasciolata* através de nested pcr. (a) peso molecular com escala de 100 pb. dna de galos receptores, (b-e) amostras de 7 dias após o transplante. (g, f) amostras de controles positivos com dna de crax *alector* e crax *fasciolata*. (h) amostra controle negativo com dna de galo não transplantado. (i) controle negativo com h₂O. as setas indicam a posição dos amplicons externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). todos os testículos receptores (b-e) mostraram a presença de material genético de cracídeo, porém as bandas de amplicons (interno) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas. 99

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para *C. alector* e *C. fasciolata* através de nested pcr. (a) peso molecular com escala de 100 pb. (b-f) dna dos galos receptores, amostras de 21 dias após o transplante; (g, h) amostras de controles positivos com dna de crax *alector* e crax *fasciolata*, respectivamente. (i) amostra controle negativo com dna de galo não transplantado. (j) controle negativo com h₂O. as setas indicam a posição dos amplicons externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). testículos receptores (c, d e f) mostraram a presença de material genético de cracídeo, porém as bandas de amplicons (interno) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas. 100

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para *C. alector* e *C. fasciolata* através de nested pcr. (a) peso molecular com escala de 100 pb. dna dos galos receptores, (b, c) testículos de 42 dias e (d, f) 120 dias após o transplante. (f, g) amostras de controles positivos com dna de crax *alector* e crax *fasciolata*, respectivamente. (h) amostra de controle negativo com dna de galo não transplantado. (i) controle negativo com h₂O. as setas indicam a posição dos amplicons externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). testículos receptores (a e e) mostraram a presença de material genético de cracídeo, porém as bandas de amplicons (interno) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas. 101

Figura 23 – Representação esquemática do posicionamento correto do embrião durante a
criosecção. 125

Figura 24 – Imunohistoquímica do tecido testicular de codorna. marcação positiva (em marrom)
do anti-qcpn 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil do ejaculado e qualidade espermática do mutum-de-alagoas (<i>pauxi mitu</i>) através da eletroestimulação.	22
Tabela 2 – Diferentes fontes de células tronco germinativas em aves.	27
Tabela 3 – Configurações utilizadas na análise da cinética espermática de galos	47
Tabela 4 – Iniciadores padronizados para quantificação de células testiculares que expressam genes marcadores de pluripotência, células germinativas primordiais, células-tronco espermatogoniais, apoptose e anti-apoptose.	51
Tabela 5 – Iniciadores utilizados na detecção de dna genômico de codorna em testículos de galos receptores.	55
Tabela 6 – Sumário de coleta de material e da dissociação de tecido testicular para a obtenção de células doadoras no período de 12/2017 a 11/2018.	92

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	REVISÃO DE LITERATURA – CÉLULAS GERMINATIVAS AVIÁRIAS.....	26
2.1	CÉLULAS BLASTODÉRMICAS E CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS (ESCs).....	27
2.2	CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS (PGC)	30
2.3	CÉLULAS TRONCO TESTICULARES (SSCs) E O NICHOS ESPERMATOGONIAL	32
2.4.	PREPARAÇÃO DOS RECEPTORES (BUSSULFANO).....	36
3	CAPÍTULO 1 – DEPLEÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS ENDÓGENAS EM GALOS ATRAVÉS DE DOSES FRACIONADAS DE BUSSULFANO – UM MÉTODO SIMPLES NA PREPARAÇÃO DE AVES RECEPTORAS.	39
3.1.	INTRODUÇÃO.....	39
3.2.1.	<i>Desenho experimental</i>	42
3.2.2.	<i>Animais</i>	43
3.2.3.	<i>Tratamento com bussulfano</i>	43
3.2.4.	<i>Monitoramento de saúde</i>	44
3.2.5.	<i>Mensuração de testosterona</i>	44
3.2.6.	<i>Análise do sêmen</i>	45
3.2.7.	<i>Processamento dos tecidos</i>	47
3.2.8.	<i>Análise histológica</i>	48
3.2.9.	<i>Imunofluorescência para a detecção de células pluripotentes</i>	49
3.2.10.	<i>Extração de RNA</i>	50
3.2.11.	<i>RT-qPCR</i>	50
3.2.12.	<i>Preparo dos galos receptores</i>	51
3.2.13.	<i>Dispersão e criopreservação de células testiculares</i>	52
3.2.14.	<i>Plaqueamento e seleção de espermatogônias</i>	53
3.2.15.	<i>Transplante de células germinativas testiculares</i>	53
3.2.16.	<i>Imunohistoquímica para a detecção de células da espécie doadora</i>	54
3.2.17.	<i>Extração do DNA genômico testicular das aves receptoras</i>	54
3.2.18.	<i>Detecção do DNA genômico de codorna</i>	55
3.2.19.	<i>Análise estatística</i>	56
3.3.	RESULTADOS	56
3.4.	DISCUSSÃO.....	72

4.	CAPÍTULO 2 – CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CRACÍDEOS AMEAÇADOS POR MEIO DE TRANSPLANTES INTERESPECÍFICOS DE CÉLULAS GERMINATIVAS.....	82
4.1.	INTRODUÇÃO.....	82
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS	84
4.2.1.	<i>Delineamento experimental</i>	84
4.2.2.	<i>Animais</i>	85
4.2.3.	<i>Preparo dos receptores</i>	86
4.2.4.	<i>Obtenção das gônadas de cracídeos</i>	86
4.2.5.	<i>Dispersão e congelamento das células testiculares</i>	87
4.2.6.	<i>Descongelamento e marcação das células doadoras</i>	87
4.2.7.	<i>Transplante celular</i>	88
4.2.8.	<i>Avaliação microscópica das células transplantadas</i>	88
4.2.9.	<i>Avaliação genética</i>	89
4.2.10.	<i>Análise estatística</i>	90
4.3.	RESULTADOS	91
4.4.	DISCUSSÃO	102
5.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	109
6.	ANEXOS.....	121
	APÊNDICES	139



Introdução

1. INTRODUÇÃO

A atual conjuntura tem levado as aves à eminente extinção, onde mais de 13% das espécies estão listadas em algum grau de ameaça (BirdLife International, 2013). Neste triste cenário, o Brasil ocupa uma posição de destaque, sendo o país com maior número de espécies listadas como criticamente ameaçadas. Neste contexto, os cracídeos são apontados como um dos grupos prioritários na elaboração de ações conservacionistas devido ao elevado número de espécies categorizadas como ameaçadas (aproximadamente 40%) (IUCN, 2019). Por essa razão, ações coletivas entre o Ministério do Meio Ambiente (MMA), instituições mantenedoras e centros de pesquisa levaram à implementação do Plano de Ação Nacional (PAN) para a conservação de Galliformes, em particular do Mutum-de-alagoas (*Pauxi mitu*), com o propósito de assegurar permanentemente a manutenção *in situ* e *ex situ* das suas populações, e de garantir a reintrodução de novos exemplares através da reprodução em cativeiro. Dessa forma, o comitê das PANs definiu em 2008 que entre as ações imediatas e de alta prioridade referentes ao manejo das populações está o desenvolvimento de metodologias para reprodução assistida dessas espécies (Silveira et al., 2008a; 2008b).

Historicamente a reprodução em cativeiro tem desempenhado um papel importantíssimo na recuperação e conservação de aves ameaçadas. Um exemplo disso foi a recuperação das populações selvagens do falcão-peregrino (*Falco peregrinus*), condor-da-califórnia (*Gymnogyps californianus*) e, grou-americano (*Grus americana*) (Blanco et al., 2009). Apesar disso, algumas espécies como no caso a ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*) apresentam grande dificuldade em se reproduzir naturalmente em cativeiro devido à baixa variabilidade genética e alta suscetibilidade ao estresse que, por conseguinte, ocasiona baixas taxas de fertilidade e eclodibilidade (Neumann et al., 2013; Fisher et al., 2014). Consequentemente, estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de maximizar o potencial reprodutivo e, assim melhorar a

Introdução

variabilidade genética através de TRAs como a coleta e criopreservação de sêmen e a inseminação artificial (IA) (Blanco et al., 2009). Todavia, tais biotecnologias muitas vezes não são utilizadas rotineiramente devido a grande maioria das aves selvagens apresentarem uma reprodução sazonal, fato que restringe a obtenção de amostras, além da dificuldade de se obter amostras com alta qualidade. Um bom exemplo disso é a baixa qualidade espermática apresentada por mutuns de Alagoas coletados por eletroestimulação como detalhado abaixo na Tabela 1 (Pereira et al., em preparação).

Tabela 1 – Perfil do ejaculado e qualidade espermática do mutum-de-alagoas (*Pauxi mitu*) através da eletroestimulação.

Espécies	ID	Mot (%)	Prog (%)	Volume (ul)	sptz/ml	Total	Viáveis
<i>Pauxi mitu</i>	CB470	5	0	5.65	680.785,6	3.847,8	1.539,1
	CB721			0.94	10.671.082,8	10.052,2	1.675,7
	CB070C	0	0	4.16	6.271.683,7	26.093,3	
	CB002A	0	0	5.18	16.767.892,3	86.874,5	
	CB02/05	10	5	6.44	7.146.245,2	46.000,4	36.800,3
	CB743	10	5	0.39	63.546.496,8	24.942,0	18.706,5
	CB367	10	5	1.96	36.259.108,3	71.158,5	49.811,0
	CB473			7.46	16.347.475,7	121.911,3	82.900,0
	CB556	5	0	2.91	6.150.976,1	17.865,5	7.146,2
	CB804			5.81	2.132.608,0	12.388,3	
Variação		0-10	0-5	0-7.46	0-63546496,8	0-121911,3	0-82900,0

Fonte: Blank (2020)

Não obstante, o espermatozoide aviário diferentemente dos mamíferos domésticos, mostra uma grande susceptibilidade ao processo criogênico exibindo baixas taxas de fertilidade pós-descongelamento (Blesbois et al., 2007a; Zaniboni et al., 2014). Durante a criopreservação, a membrana espermática aviária é aparentemente mais suscetível as modificações estruturais durante a transição da fase líquido-cristalina para gel, resultando em maior formação de cristais de gelo, maior estresse osmótico e danos oxidativos e, em última análise, baixa viabilidade celular após o descongelamento (Drobnis et al., 1993; Watson, 1995; Watson, 2000). Por essa razão, ao longo dos últimos 20 anos, um considerável interesse na manipulação de células

germinativas tem proporcionado sua aplicação em três grandes áreas do conhecimento: (a) investigação da gametogênese e suas correlações com a fertilidade; (b) produção de gametas transgênicos pela manipulação genética das células tronco germinativas embrionárias; e (c) manutenção de estoques genéticos por tempo indeterminado em animais receptores (Dobrinski, 2008; Nakamura et al., 2013; Russel e Griswold, 2000). Em aves, os primeiros relatos nesse tema descrevem transplantes intraespecíficos de células germinativas primordiais e células testiculares em galos domésticos, onde ficou comprovada a possibilidade de animais receptores produzirem descendentes viáveis de outras raças (Nakamura et al., 2010a; Nakamura et al., 2011; Trefil et al., 2006). Simultaneamente, diversos pesquisadores confirmaram que xenotransplantes de células do blastoderma (CBs) ou de células germinativas primordiais (CGPs) em embriões de galinha resultavam em recipientes capazes de produzir progênie de outras espécies, tais como codornas, patos, faisões e abertadas (Kang et al., 2009; Li et al., 2002; Ono et al., 1996; Soh et al., 2004; Roe et al., 2013; Wernery et al., 2010). No entanto, até o momento, certas particularidades das CBs e CGPs (p.e. eficiência reduzida, desperdício de ovos férteis, etc.) limitam o aproveitamento destas células na conservação de espécies criticamente ameaçadas.

Em paralelo, alguns estudos têm investigado a viabilidade da utilização de células provenientes de machos adultos em transplantes intra e interespecíficos entre codornas e galos (Lee et al., 2006; Kim et al., 2018; Pereira et al., 2013). Estes estudos demonstraram que semanas após os transplantes essas células não apenas colonizaram os túbulos seminíferos dos receptores, como também possuíam a habilidade de produzir espermatozoides e progênies. Tais achados ampliaram as opções de material que podem ser resgatados de espécies de interesse para futuros xenotransplantes germinativos, além de abrirem a perspectiva de recuperar células germinativas *post-mortem* (p.e. coleta de testículos de embriões machos, machos adultos) ou *in vivo* (p.e. aspirações de células testiculares via endoscópica). Contudo, a viabilidade da

utilização de células congeladas/descongeladas e a transmissão da linha germinativa através de receptores tratados com bulsulfano são áreas que ainda precisam de maior desenvolvimento. Desde modo, em continuidade as pesquisas já realizadas na área, este projeto teve como objetivo: (a) desenvolver uma metodologia simples e eficaz de preparo de receptores para transplantes de células germinativas utilizando um modelo codorna/galo e (b) investigar a capacidade de espermatogônias criopreservadas de cracídeos recém-falecidos em colonizar os túbulos seminíferos de galos receptores. Os dados gerados por esse estudo serão relevantes para a manutenção da biodiversidade genética de cracídeos ameaçados, pois servirão de base para o desenvolvimento de uma metodologia inovadora para conservação e disseminação de material genético de machos de várias idades (de embriões a indivíduos senis), vivos ou mortos.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA – CÉLULAS GERMINATIVAS AVIÁRIAS.

As aves são imprescindíveis em nossa sociedade, seja por seu papel em estudos multidisciplinares, por sua importância na indústria ou por seus serviços ambientais prestados, como no controle de pragas, na polinização e dispersão de frutos e sementes (Galetti et al., 2013; Gerber et al., 2007; Han, 2009; Stern, 2005). Contudo, atividades antrópicas têm elevado o número de espécies ameaçadas e, segundo a união internacional para a conservação da natureza e dos recursos naturais, mais de 14% das espécies aviárias estão listadas como ameaçadas de extinção (IUCN, 2019). Portanto, é de extrema importância desenvolver sistemas integrados para a conservação de germoplasma de aves; no entanto, as técnicas estabelecidas para conservação genética de mamíferos não podem ser transferidas diretamente para espécies aviárias, principalmente devido à alta intolerância de seus gametas e embriões ao processo criogênico (Blesbois et al., 2007b; Woodcock et al., 2019). Por essa razão, a utilização de células germinativas tem atraído interesse devido suas características. Elas são o único tipo de célula capaz de transmitir informações genéticas a próxima geração e, além de serem competentes para a linha germinativa, também servem como células-tronco. Conseqüentemente, sua manipulação é valiosa em diferentes frentes de estudo, incluindo o desenvolvimento da linha germinativa, investigação da gametogênese, produção de linhagens celulares, geração de aves transgênicas para aplicações comerciais e de pesquisa e, na manutenção de estoques genéticos por tempo indeterminado (Nakamura et al., 2013; Park et al., 2014).

Até o momento, as aves são o único grupo não mamífero onde linhagens de células-tronco embrionárias e células germinativas estáveis foram estabelecidas. Tal feito pode ser justificado devido a inúmeras vantagens, como a facilidade de obtenção e manipulação do embrião (Berg et al., 1999) e, notável capacidade de regeneração embrionária ainda em estágio

de blastodisco (Bertocchini et al., 2004; Bertocchini e Stern, 2012). Consequentemente, é a partir destes estágios iniciais de desenvolvimento (linha pré-primitiva) que linhagens celulares análogas às células-tronco embrionárias de mamíferos (ESCs) podem ser estabelecidas a partir de células dissociadas da região central do epiblasto. No entanto, diferentes tipos de células-tronco competentes para a linha germinativa podem ser estabelecidos de acordo com o estágio de desenvolvimento da ave (Tabela 2).

Tabela 2 – Diferentes fontes de células tronco germinativas em aves.

Tipo celular	Origem	Método de confirmação	Eficiência de transmissão	Marcadores
ESCs	Estágio X (EG&K)	Formação do EB, diferenciação <i>in vitro</i> , quimeras somáticas	+	VASA/DAZL/SSEA-1/PAS
PGCs	Estágio 14-17 (H&H)	Quimeras germinativas	+++	VASA/DAZL/SSEA-1/EMA-1/PAS/SDF1/CXCR4
EGCs	Estágio 25-28 (H&H)	Formação do EB, diferenciação <i>in vitro</i> , quimeras somáticas	+++	VASA/DAZL/SSEA-1/EMA-1/PAS/SDF1/CXCR4/NA NOG
SSCs	Estágios pós-natal	Formação do EB, diferenciação <i>in vitro</i> , quimeras somáticas	+	VASA/DAZL/SSEA-1/NANOG/POUV

Fonte: Blank (2020)

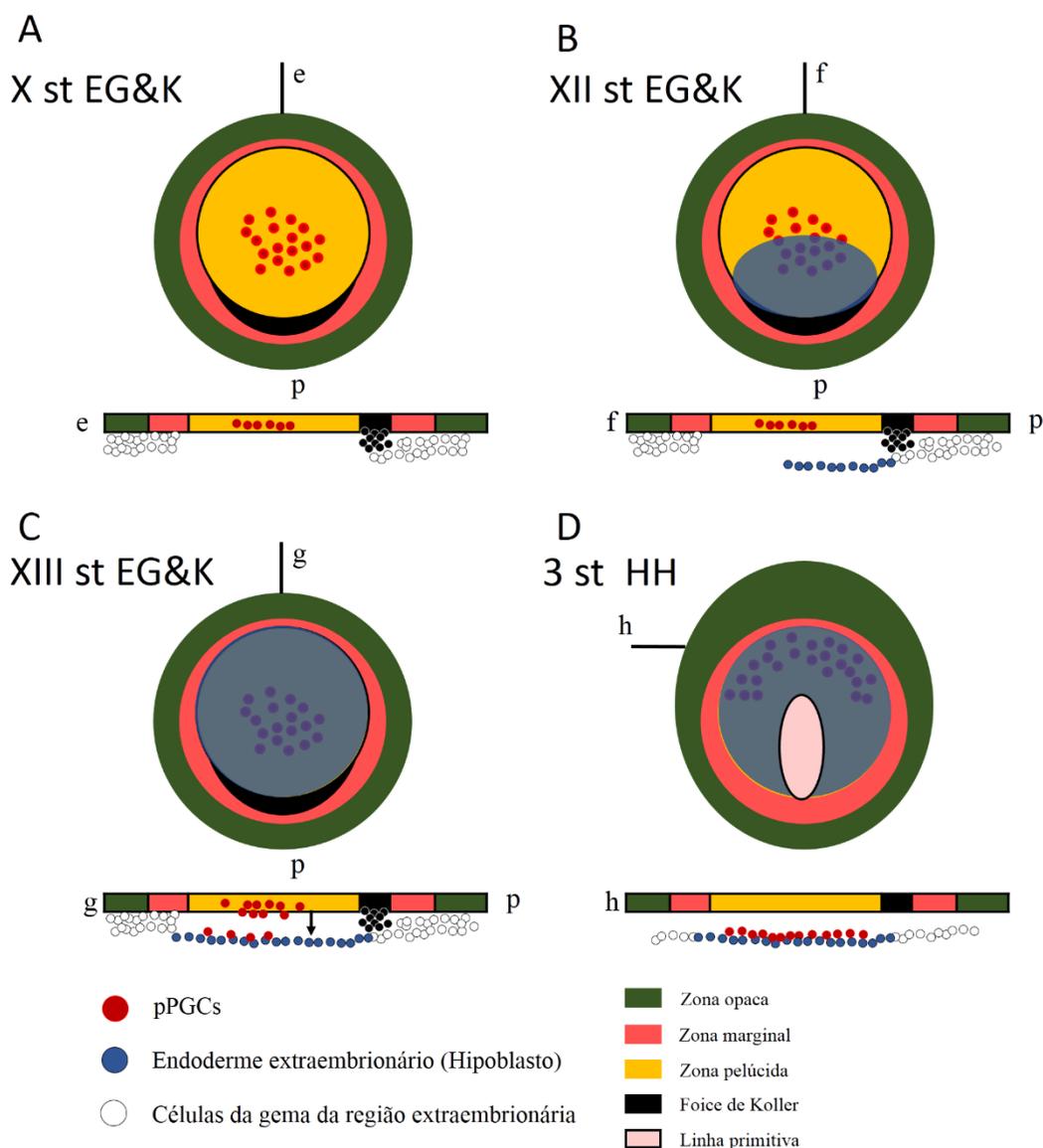
Portanto, para aplicações práticas, é importante entender a origem de cada tipo celular e as técnicas aplicadas a elas. Assim, fornecemos aqui informações sobre as células-tronco germinativas aviárias, enfatizando os métodos de derivação, cultura e transplantes empregados.

2.1 CÉLULAS BLASTODÉRMICAS E CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS (ESCS)

Após a fecundação, o embrião aviário passa suas primeiras horas de desenvolvimento ainda no útero e, durante este período, a divisão celular ocorre no padrão meroblástico (planos de clivagem aberta, do centro para a gema) gerando um disco. Após a oviposição, o blastodisco

formado compreende de 20.000 a 50.000 células dispostas principalmente como uma camada única (epiblasto) subjacente as células da gema (hipoblasto – endoderme extraembrionária) (Sterm, 2004). Neste período, as células germinativas primordiais (PGCs) estão normalmente localizadas na região central da área pelúcida, surgindo nos estágios pré-primitivos do epiblasto, juntando-se às células hipoblásticas abaixo (Ginsburg, 1997; Ginsburg e Eyal-Giladi, 1986, 1987; Karagenc et al., 1996; Petite et al., 1997). Nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, as PGCs iniciam seu processo de migração e diferenciação através de movimentos morfogênicos induzidos pelo embrião e pela camada do hipoblasto, que forma uma camada contínua de células que se move para a parte mais anterior do embrião, sob o pré-âmnio, transportando as PGCs para essa região, conhecida como crescente germinal (Figura 1).

Figura 1 – Esquema resumido sobre a distribuição das células germinativas primordiais (PGCs) em embriões de galinha a partir do início da pré-gastrulação (A, estágio X – EGK) até a fase medial da gastrulação (D, estágio 3 HH) e suas respectivas secções (e-h). Todos os esquemas mostram a visão ventral dos embriões. A (e): embriões em estágio X com pPGCs espalhadas na região central da camada do epiblasto. B (f): embrião em estágio XII, com a crescente camada de hipoblasto, e os pPGCs ainda no epiblasto. C (g): embrião do estágio XIII, com o hipoblasto totalmente expandido, que hospeda as pPGCs que caem do epiblasto. D (h): estágio 3 HH (linha pré-primitiva), as pPGCs são deslocadas junto com o hipoblasto em direção à crescente germinativa.



Adaptado de Bertocchini e Lopes, 2016.

Diferentemente das PGCs e SSCs, células-tronco embrionárias (ESCs) podem ser facilmente obtidas e manipuladas a partir de ovos fertilizados, garantindo um modelo acessível em estudos envolvendo a produção de quimeras germinativas e aves transgênicas (Han et al., 2015). Um exemplo disso são os estudos envolvendo a transfecção de vetores retrovirais e lentivirais em embriões de estágio X (EGK) cuja expressão transgênica foi observada em

diversos tecidos somáticos e germinativos (Bosselman et al., 1989; McGrew et al., 2004). Além disso, quando isoladas e transplantadas, quimeras somáticas e germinativas foram produzidas a partir de células blastodermis intra e interespecíficas (Carsience et al., 1993; Li et al., 2002; Petite et al., 1990; Soh et al., 2004). Contudo, um problema atrelado à utilização de ESCs está na baixa eficiência de transmissão da linha germinativa, que em condições *in vitro* apresenta uma redução ainda maior (Lavial et al., 2009). Não obstante, as células germinativas já estão segregadas no estágio X (EGK), cujo o número de PGCs entre as células blastodérmicas é extremamente reduzido nesta fase embrionária (Tsunekawa et al., 2000). Por essa razão, a utilização de células blastodérmicas ou ESCs ainda é limitada necessitando de maiores informações sobre os mecanismos relacionados na diferenciação e formação das PGCs.

2.2 CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS (PGC)

A diferenciação das células germinativas em gametas é um processo altamente regulado *in vivo*. Embora, a totalidade dos mecanismos no controle e diferenciação dessas células em gametas ainda é desconhecida, acreditasse que em aves as PGCs se originam através de determinantes genéticos herdados pela mãe (*Chicken vasa homologue*) (Lavial et al., 2009). Em aves, as PGCs foram identificadas pela primeira no final do século XIX, quando Waldeyer as observou no epitélio germinativo de embriões de galinha (Waldeyer et al., 1870). Posteriormente, Swift relatou que as PGCs aviárias surgiam em uma região extraembrionária denominada de crescente germinativa, localizada na região anterior e formada durante a gastrulação (Swift, 1914). Isto também é observado em mamíferos, no entanto, nas aves o veículo utilizado durante a migração das PGCs é o sistema vascular através das veias vitelínicas anteriores durante os estágios 12-16 HH (Bernardo et al., 2012). No entanto, como a circulação sanguínea em embriões de galinha é transitória, o momento apropriado para a coleta e transplante das PGCs deve ser verificada, sendo que o acesso à vasculatura em desenvolvimento

é tecnicamente difícil anteriormente ao estágio 13 HH (Perry, 1988). Assim, diferentes grupos têm coletado PGCs circulantes entre os estágios 14-16 HH através de diferentes sítios vasculares como nos vasos vitelínicos, coração e aorta dorsal (Motono et al., 2010; Mozdziak et al., 2005; Nakamura et al., 2007; Nakamura et al., 2010; Tajima et al., 1999; Yamamoto et al., 2007; Yasuda et al., 1992; Zhao and Kuwana, 2003). Evidências circunstanciais também foram fornecidas por Nakamura et al. (1992) quando injetaram PGCs de codorna em vasos vitelínicos de embriões de galinha no estágio 15 HH e depois observaram as PGCs de codorna nas cristas genitais dos receptores.

Todavia, devido à sua origem extraembrionária e rotas de migração específicas, PGCs podem ser coletadas através de quatro regiões: I) a partir do blastoderme no estágio X (EGK); II) na crescente germinativa durante a gastrulação no estágio 4 HH; III) no sistema vascular inicial entre os estágios 13 a 16 HH e; IV) a partir das gônadas primordiais entre os estágios 25-28 HH (Li et al, 2002; Intarapat and Stern, 2013). Embora a utilização de PGCs derivadas de células blastodermis, da crescente germinativa e da vascularização já tenham sido amplamente descritas em diferentes circunstâncias. A utilização de PGCs gonadais (gPGCs) tem gerado algumas vantagens na produção de aves quiméricas devido ao maior número de células obtidas por embrião quando comparado aos outros estágios (i.e., cESCs, cPGCs and SSCs) (Tajima et al. 1998) além, de manter sua eficiência de transmissão da linha germinativa (Han et al., 2015). Além disso, o estabelecimento de técnicas de seleção e cultivo de PGCs a longo prazo têm resultado em avanços notáveis na biotecnologia aviária (Chen et al., 2018; Kong et al., 2018; Ono e Machida, 1999; Park et al., 2003).

Dessa forma, através da transfecção não viral de PGCs cultivadas, os transgenes foram expressos fortemente nas galinhas transgênicas por gerações (Leighton et al., 2008; Macdonald et al., 2012; Park e Han, 2012). Além disso, aves knockout foram produzidas pela edição genômica das PGCs usando nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) e

recombinação homóloga (Park et al., 2014a; Schusser et al., 2013). Em particular, como as galinhas knockout da TALEN não são transgênicas, elas podem ser amplamente usadas nas práticas agrícolas (Park et al., 2014a). Mais recentemente, a utilização de repetições palindrômicas curtas e inter-espaçadas regulamente agrupadas a proteína associada CRISPR 9 (Cas9) tem facilitado a produção de aves geneticamente modificadas. Um exemplo disso é a adição de genes fluorescentes direcionados ao cromossomo Z de células germinativas para o desenvolvimento de modelos de sexagem aviária (Lee et al., 2019). Apesar do promissor potencial na indústria e conservação, a utilização de animais geneticamente modificados enfrenta barreiras éticas e legais que merecem ser discutidas previamente a sua utilização.

Em última análise, a utilização de PGCs têm proporcionado a manutenção genética tanto feminina quanto masculina permitindo a retenção de toda linhagem genética. Além disso, à acessibilidade na obtenção das PGCs aviárias oferece uma oportunidade única para a coleta e transplante, como também é um meio para estudar o desenvolvimento e diferenciação de células germinativas aviárias. Por outro lado, a utilização de PGCs é limitada a um determinado período embrionário, dificultando sua aplicação em programas de conservação.

2.3 CÉLULAS TRONCO TESTICULARES (SSCS) E O NICHOS ESPERMATOGONIAL

Após entrar nas gônadas embrionárias, PGCs sofrem diferenciação sexual e entram em parada mitótica no oitavo dia de desenvolvimento embrionário (i.e., *Gallus gallus*) (Zheng et al., 2009). Tal diferenciação induz uma redução na taxa de transmissão da linhagem germinativa. No entanto, não impede sua aplicação na produção de animais transgênicos e na manutenção de estoques genéticos devido a manutenção da capacidade unipotente destas

células (Trefil et al., 2006). Por exemplo, alguns estudos demonstraram que o transplante de SSCs em testículos receptores é capaz de gerar descendentes derivados dos doadores (Lee et al., 2006; Trefil et al., 2006). Além disso, transplantes de SSCs tanto para blastodermes no estágio X (EGK) quanto nos vasos sanguíneos de embriões (16 HH) são capazes de produzir descendentes derivados dos doadores (Jung et al., 2010). Mais recentemente, Pereira et al. e Roe et al (2013) demonstraram a capacidade de transplantes xenogênicos de SSCs em colonizar testículos de embriões e aves adultas. Apesar deste avanço no estudo das SSCs, a diferença genética continua sendo um limitante nos transplantes germinativos uma vez que nenhum estudo relatou a produção de proles derivadas de transplantes filogeneticamente distantes.

Para que uma SSC progrida até um espermatozoide, é necessária a existência de um nicho, formado por vários componentes celulares e extracelular que juntos formam um microambiente regulado por fatores parácrinos e endócrinos. O processo de organização do nicho, auto renovação, diferenciação e desenvolvimento da SSC foi pouco explorado em aves. Portanto, seguiremos um modelo mamífero para discutir os principais componentes e fatores que regulam o nicho espermátogonial. Assim, leitores interessados nestes processos devem se referir às excelentes revisões publicadas anteriormente (de Rooji, 2017; Kitadate et al., 2019; Lord e Oatley, 2017; Oatley e Brinster, 2012; Potter e DeFalco, 2017; Svinger e Koopman, 2013; Takashima e Shinohara, 2018; Yoshida, 2018). Todavia, é importante delinear brevemente as células relacionadas ao nicho e seus principais fatores moleculares que desempenham um papel nos processos de organização do nicho e, principalmente, na manutenção e auto renovação da SSC.

As células de Sertoli (CS) são as únicas células do nicho que entram em contato direto com as células germinativas (SSCs) e, assim como nos mamíferos, residem sob a membrana basal dos túbulos seminíferos nas aves. Devido a sua associação física com as células germinativas, as CSs são indiscutivelmente o principal colaborador do nicho testicular,

responsável em fornecer diversos fatores responsáveis pela manutenção e diferenciação das SSCs. Entre estes, o fator neurotrófico derivado das células da glia (GDNF) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) são os mais estudados e, aparentemente exercem um papel importante na auto renovação e diferenciação das SSCs aviárias *in vitro* (Jung et al., 2007). Durante o desenvolvimento embrionário, baixos níveis de GDNF já são detectáveis nas gônadas bipotenciais de camundongo (Beverdam e Koopman, 2005), e sua expressão aumenta constantemente atingindo um máximo no dia 3 pós-natal, quando a população de SSCs começa se expandir (Tadokoro et al., 2002). Por outro lado, em animais mais velhos, os níveis de expressão de GDNF variam entre as etapas do ciclo epitelial seminífero sendo observada maior expressão nas fases de proliferação indiferenciadas e menor expressão nas fases de inatividade cuja as células já estão diferenciadas (Johnston et al., 2011). Essas observações indicam que os níveis de GDNF são cíclicos e sua dose é crucial na regulação e proliferação das células germinativas perinatais. Além disso, tal conjuntura corrobora com a afirmação que o nicho espermatogonial fornece diferentes conjuntos de sinais as SSCs dependendo do momento do desenvolvimento testicular. Por exemplo, no testículo neonatal, a auto-renovação ativa do SSC ocorre para estabelecer o pool de células-tronco, e estudos demonstraram que os nichos neonatais são mais eficientes do que os adultos para regenerar a espermatogênese a partir de SSCs transplantadas (Shinohara et al., 2001). Por outro lado, a auto-renovação da SSC no adulto pode ocorrer apenas em determinadas etapas do ciclo seminífero (Johnston et al., 2011) limitando os sítios de colonização e auto renovação das SSCs transplantadas.

Não obstante, é importante mencionar o papel crítico que as CS desempenham na formação da chamada barreira hemato-testicular. Essa barreira física, formada pelas junções justapostas (*tight junction*) das CS, segrega as espermatogonias no compartimento basal do epitélio seminífero dos espermátócitos e espermátideos no compartimento apical (Griswold, 2018) e, limita o sitio de colonização das SSCs transplantadas. Nas aves, a completa formação

desta estrutura ocorre após à oitava semana pós-natal a partir da interrupção da proliferação das CS (Bozkurt et al., 2007).

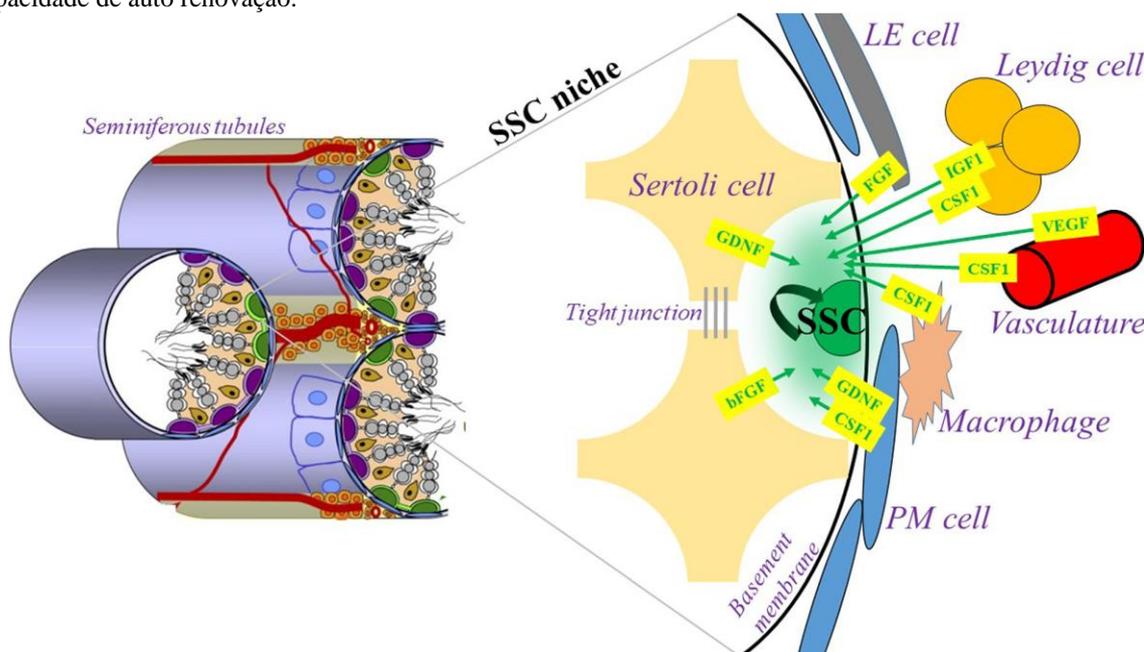
As células de Leydig (CL) são responsáveis pela produção de alguns fatores importantes na proliferação das SSCs como o fator estimulante de colônias 1 (CSF1) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), no entanto, os efeitos mitogênicos de ambas as moléculas são alcançados apenas em conjunto com o GDNF (Huang et al., 2009; Oatley et al., 2009). Embora alguns estudos tenham associado o hormônio folículo estimulante (FSH) como o maior regulador positivo da expressão de GDNF pelas CS (Tadokoro et al., 2002; Ding et al., 2011). Novas descobertas sugerem que o hormônio luteinizante (LH) juntamente com a testosterona produzida pelas CL exercem um papel crucial na regulação da auto renovação das SSCs (Tanaka et al., 2016). Além disso, as CL também estimulam o desenvolvimento da gônada e mantêm a espermatogênese via produção de testosterona (Zheng et al., 2014). Os macrófagos produzem 25-hidroxicolesterol, um composto que participa da biossíntese da testosterona e, portanto, os macrófagos podem regular a produção de testosterona nos testículos (Hutson, 1992; Nes et al., 2000). DeFalco et al. (2015) propuseram também que os macrófagos podem contribuir para a proliferação / auto renovação das SSCs através da secreção de CSF1.

A vasculatura também exerce um papel importante na manutenção e auto renovação das SSCs. Isso tem sido observado em mamíferos como em touros (Caires et al., 2009) e camundongos (Tian et al., 2015) cujo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) regula positivamente a proliferação de células germinativas. Em aves, o transplante de enxertos testiculares próximos a regiões altamente vascularizadas tem proporcionado uma maior taxa de reestruturação tecidual e diferenciação das células germinativas indicado um maior suporte nutricional e acesso a fatores de crescimento e diferenciação das SSCs (Song e Silversides, 2008). Além disso, recentemente foi relatado que células endoteliais próximas à vasculatura

secretam ligantes da família do fator de crescimento de fibroblasto que atua como mitógeno das células tronco testiculares (Kitadate et al., 2019).

Por fim, embora pouca atenção tenha sido dada ao papel das células mióides no processo de auto renovação das SSC. Recentemente estudos tem demonstrado que o GDNF pode ser expresso também pelas células mióides peritubulares nos testículos de camundongo (Chen et al., 2014). Chen et al. (2016) mostraram em camundongo que a testosterona induz a secreção de GDNF através das células mióides in vitro. Além disso, outros fatores que interagem com as SSCs são expressos nas células mióides (i.e., CSF1) (Oatley et al., 2009; DeFalco et al., 2015).

Figura 2 – Representação gráfica do nicho testicular espermatogonial. GDNF – fator neurotrófico derivado da glia; bFGF – fator de crescimento fibroblástico básico; CSF1 – fator estimulador de colônias 1; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; IGF1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; LE cell – célula endotelial linfática intersticial; PM cell - células mióides peritubulares; SSC - célula-tronco espermatogonial com capacidade de auto renovação.

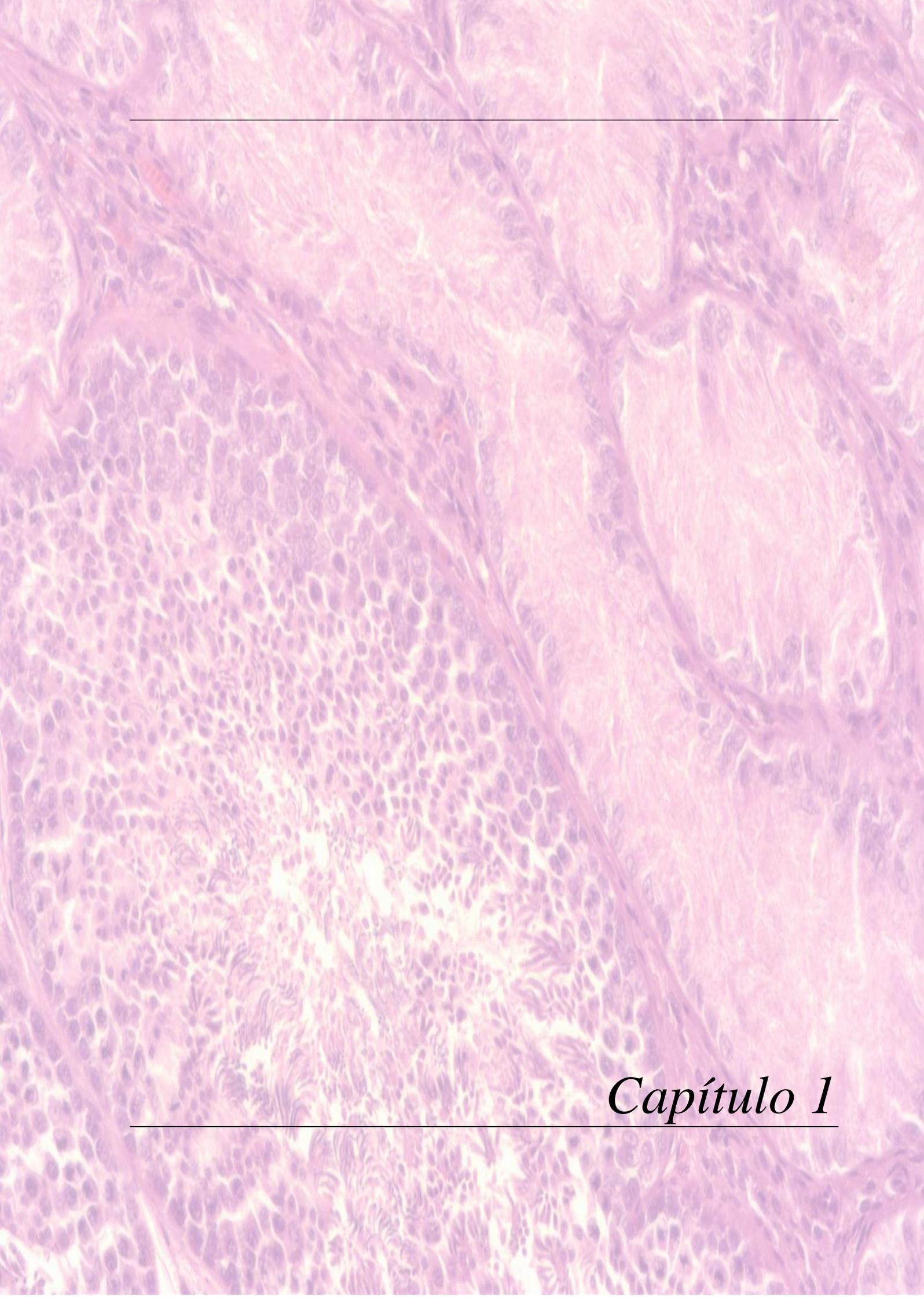


Fonte: Savvulidi et al., 2019

2.4. PREPARAÇÃO DOS RECEPTORES (BUSSULFANO)

Uma das etapas fundamentais no sucesso do transplante de células germinativa é a preparação dos receptores. Embora, a maioria dos estudos vêm direcionando o uso de animais

imaturos devido a um microambiente testicular mais favorável comparado ao testículo adulto (Shinohara et al., 2001). A eliminação das células endógenas do hospedeiro é necessária para favorecer a colonização e expansão das células doadoras. Dessa forma, uma das metodologias mais empregadas no transplante de células germinativas é o tratamento com bussulfano (Clouthier et al., 1996; Dobrinski et al., 1999; Dobrinski et al., 2000; Hermann et al., 2007; Nobrega et al., 2010; Ogawa et al., 1999; Russel e Brinster, 1996; Tagirov e Golovan, 2012). O bussulfano contém dois grupos funcionais de metanosulfonato de metil que atuam na fase G0/G1 nas células através da alquilação do DNA. Isto resulta no mau pareamento das bases resultando no bloqueio da replicação, transcrição do DNA e na inibição da proliferação e diferenciação celular (Iwamoto et al., 2004). Além disso, o bussulfano tem a capacidade de destruir os filamentos de vimentina que formam as junções justapostas entre as células de Sertoli afetando a estabilidade do nicho testicular das SSCs (Amann, 2008; Cai et al., 2016). Apesar do bussulfano agir especificamente em células mitóticas como SSCs, sua toxicidade continua incerta e, por conseguinte, alguns autores têm reportado efeitos deletérios locais como nas células de Sertoli (Anand et al., 2016; Bhartiya e Arnand, 2017), como também sistêmicos (Honamooz et al., 2005). Por exemplo, em cordeiros o tratamento pode induzir diarreia com letargia e falta de apetite (Olejnik et al., 2018), como também induzir a depleção de células germinativas de neonatos através do tratamento ainda em período pré-natal (Honamooz et al., 2005).



Capítulo 1

3 CAPÍTULO 1 – DEPLEÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS ENDÓGENAS EM GALOS ATRAVÉS DE DOSES FRACIONADAS DE BUSSULFANO – UM MÉTODO SIMPLES NA PREPARAÇÃO DE AVES RECEPTORAS.

3.1. INTRODUÇÃO

O manejo da diversidade genética em aves é considerado desafiador devido a algumas particularidades anatômicas e fisiológicas dessa classe. Por exemplo, a enorme quantidade de gema nos ovos de aves inviabiliza o congelamento de oócitos e embriões, técnicas usadas regularmente em programas de criação de mamíferos (Blesbois, 2007; Kang et al., 2008; Song e Silversides, 2008). Conseqüentemente, a criopreservação de sêmen é atualmente o procedimento mais adequado para o banco de germoplasma em espécies aviárias (Blesbois, 2007; Woelders et al., 2006). No entanto, mesmo amplamente reconhecidas, diferenças intra e interespecíficas na susceptibilidade dos espermatozoides ao congelamento dificultam sua ampla aplicação em aves domésticas e selvagens (Blesbois, 2007; Blanco et al., 2000; Saint-Jalme et al., 2003; Blesbois et al., 2003). Assim, tecnologias inovadoras, como a geração de quimeras de linha germinativa através do transplante de células germinativas primordiais (PGCs) ou células-tronco espermatogoniais (SSCs) tem sido investigada com o objetivo de fornecer aves receptoras que produzam gametas derivados de doadores (Kang et al., 2008; Trefil et al., 2003; Shin et al., 2008; Liu et al., 2012; Pereira et al., 2013).

Sabe-se que a depleção ou eliminação de células-tronco endógenas nos testículos receptores aumentam a eficiência do transplante de células germinativas, tornando os nichos de SSC mais acessíveis às células doadoras (Song et al., 2005; Dobrinski, 2008;

Capítulo 1

Nakamura et al., 2010; Tajima, 2013; González e Dobrinski, 2015). Para este fim, duas abordagens vêm sendo empregadas em espécies aviárias: (1) aplicação precoce de bussulfano em embriões receptores (Song et al., 2005; Nakamura et al., 2010; Aige-Gil e Simkiss, 1991; Nakamura et al., 2008) e (2) irradiação testicular fracionada (Trefil et al., 2003; Pereira et al., 2013; Trefil et al., 2006). Apesar das injeções de bussulfano na gema terem sido aplicadas há muito tempo na preparação de embriões parcialmente esterilizados, a proliferação de compensatória de PGCs endógenas pós-transplante (Lee et al., 2013a) limita sua aplicação para o transplante de SSC em filhotes jovens ou receptores imaturos. Além disso, a irradiação local dos testículos mostra poucos efeitos sistêmicos e preserva as células somáticas testiculares (Trefil et al., 2003; Pereira et al., 2013), mas requer equipamentos caros, tornando-os impraticáveis em condições de campo.

Na tentativa de desenvolver protocolos mais acessíveis para a depleção de células germinativas nos testículos receptores antes da transferência de SSCs, pesquisadores examinaram recentemente a administração de bussulfano em galos imaturos e adultos (YunBo et al., 2009; Yu et al., 2010; Tagirov e Golovan, 2012). No entanto, a tolerância dos galos ao tratamento com bussulfano parece ser baixa, uma vez que a toxicidade aguda e morte foram observadas com doses variando de 35 a 60 mg/kg (Yu et al., 2010; Tagirov e Golovan, 2012). Para mitigar esses efeitos, Tagirov e Golovan (2012) avaliaram a aplicação de doses fracionadas de bussulfano (40 + 20 mg/kg com 10 dias de intervalo) em galos púberes, que suprimiram com sucesso a espermatogênese sem complicações graves para o organismo. Esses autores também relataram que doses fracionadas (20 + 20 mg/kg) produziram uma esterilização mais eficiente do que injeções únicas (40 mg/kg), uma vez que as aves que receberam duas aplicações exibiram uma redução de 23% na

Capítulo 1

concentração espermática e atraso na espermatogênese em oito dias em comparação com indivíduos de dose única.

Embora promissores, refinamentos e estudos adicionais são necessários para otimizar a utilização de doses fracionadas de bussulfano em aves receptoras, particularmente em idades mais jovens (p.e., pintos de um dia de idade). Isso ocorre porque o uso de animais neonatais como receptores aumenta acentuadamente o número e o comprimento das colônias de células doadoras após o transplante de SSC devido a (1) maior acessibilidade aos nichos de SSC (como resultado da camada única de células germinativas que revestem os túbulos seminíferos e da ausência de junções celulares de Sertoli) e (2) maior suporte de nichos à expansão da SSC (por fatores hormonais e de crescimento) (González e Dobrinski, 2015; Balis, 1997; Shinohara et al., 2001; Shinohara, 2002; Oatley e Brinster, 2012). Além disso, outra possível vantagem do uso de pintos recém-nascidos durante a preparação do recipiente com bussulfano depende do conhecimento prévio de que crianças e animais jovens aparentemente demonstram uma maior tolerância à quimioterapia em comparação com adultos (Balis, 1997; Dobrinski e Travis, 2007; Russell e Kangaroo, 2008). Portanto, o presente estudo foi desenhado e dividido em duas etapas: 1) avaliação da sobrevivência, tolerabilidade, secreção de testosterona, produção de espermatozoides e depleção de células germinativas endógenas em frangos receptores submetidos a diferentes doses fracionadas de bussulfano em idade tenra e, 2) avaliação da colonização e diferenciação de xenotransplantes testiculares submetidos ou não ao plaqueamento diferencial utilizando receptores tratados com bussulfano (dose determinada através do primeiro estudo). Este estudo tem como finalidade determinar se essa estratégia pode ou não ser usada na preparação de aves receptoras no transplante xenogênico de células germinativas testiculares.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Desenho experimental

Cem pintinhos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: controle (CON); injeções de veículo (VE); e injeções de bussulfano nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg (grupos Bu10, Bu20 e Bu40, respectivamente). Exceto os controles, todos os indivíduos foram tratados durante 5 semanas, recebendo injeções semanais de veículo (VE) ou bussulfano (grupos Bu). Durante o tratamento, os parâmetros de sobrevivência e desempenho, incluindo peso corporal (PC) e consumo de ração (CR), foram coletados semanalmente. Como nosso objetivo subsequente é realizar o transplante de SSC em aves jovens para melhorar o sítio de colonização e expansão das células doadoras, 15 receptores de cada grupo foram sacrificados após o tratamento quimioterápico (6 semanas de idade) para coleta de sangue e testículos com o objetivo de avaliar sua resposta ao tratamento antes da cessação da proliferação das células de Sertoli (ou seja, 8 semanas de idade (Bozkurt et al., 2007)). O processamento sanguíneo consistiu no teste de hematócrito, enquanto os testículos foram pesados e encaminhados para exame histológico, imunofluorescência e RT-qPCR. Os demais receptores (cinco aves por grupo) foram mantidos até 30 semanas de idade para mensuração da testosterona plasmática a cada cinco semanas e para estimativa semanal da produção de espermatozoides. Finalmente, esses indivíduos foram sacrificados e os testículos foram pesados e processados para análise histológica e imunofluorescência.

Após a análise dos resultados, 14 pintos (*Gallus gallus*) foram selecionados como recipientes para a realização dos transplantes interespecíficos. Todos os indivíduos foram tratados igualmente e, utilizando a dose de bussulfano estabelecida pelo experimento antecedente. Após o tratamento quimioterápico, as aves aguardaram um período de

Capítulo 1

recuperação (4–5 semanas) e, em seguida, foram submetidas ao transplante de células tronco testiculares de codorna descongeladas para verificar a aplicabilidade da utilização de receptores tratados com doses fracionadas de bussulfano como método a ser empregado em estudos envolvendo transplante de SSC em aves.

3.2.2. Animais

Pintos machos Hyssex White recém-eclodidos foram alojados no Departamento de Reprodução Animal (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo) em gaiolas do tipo colônia (16 pintos por gaiola, Super Brooder BRS20-39X14X13-SS, Alternative Design Inc., Siloam Springs, AR) sob fotoperíodo natural. Água e alimento (Aves em Crescimento, Presense Nutrição Animal, Brasil) foram fornecido *ad libitum*. Posteriormente, cinco pintos de cada grupo experimental foram mantidos nas mesmas condições de 6 a 10 semanas de idade e alojados em gaiolas de 2 galos (83 x 45 x 44 cm) até 30 semanas de idade. Aves adultas (> 18 semanas) foram mantidas em um fotoperíodo de 14 horas luz, alimentadas com dieta comercial uma vez ao dia (120 g/dia, 2750 kcal ME/kg, 17% PB e 3% Ca – Presense Postura 17, Presença Nutrição Animal, Brasil) e acesso à água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 2678/2017 – CEUAVET / FMVZ).

3.2.3. Tratamento com bussulfano

O Bussulfano (1,4-butanediol dimethanesulfonate, Bu) e DMF (N, N-dimethylformamide) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O Bussulfano foi primeiramente dissolvido em DMF e, imediatamente antes da administração, uma

Capítulo 1

quantidade igual de água destilada (37° C) foi adicionada para atingir a concentração necessária. Além disso, pesos médios semanais de cada grupo experimental foram utilizados para ajustar a concentração das soluções de bussulfano a serem injetadas. As injeções de bussulfano e veículo foram administradas intraperitonealmente (volume variando de 0,3 a 0,5 mL) usando seringas de tuberculina (Luer slip 1mL 0,38 x 13 mm, BD Plastipak).

3.2.4. Monitoramento de saúde

Para avaliar a influência de doses fracionadas de bussulfano no estado de saúde, a sobrevivência, o peso corporal (PC) e o consumo de ração (CR) foram medidos semanalmente durante todo o tratamento (semanas 1 a 5). Como os animais do mesmo grupo experimental foram alojados juntos, o consumo de ração foi calculado como a diferença entre a ração oferecida e o excedente existente no final da semana, dividindo pelo número de pintos por gaiola. Além disso, como o bussulfano prejudica as linhas celulares hematopoiéticas (González e Dobrinski, 2015), amostras de sangue foram coletadas antes da eutanásia para realizar testes de hematócrito.

3.2.5. Mensuração de testosterona

Entre a 10 e 30 semanas de idade, amostras de sangue foram coletadas a cada cinco semanas, transferidas para microtubos de poliestireno heparinizados (aproximadamente 20 IU de heparina sódica / mL) e mantidos em geladeira antes da separação do plasma (4° C). No laboratório, as amostras de sangue foram centrifugadas (4° C, 3000 g, 10 min) e o plasma foi armazenado a -20° C até o teste. Os protocolos de imunoenensaio enzimático (EIA) foram realizados seguindo Brown et al. (2004), e o anti-

Capítulo 1

soro para detecção de testosterona foi fornecido por C. Munro (Universidade da Califórnia, CA, USA). As reatividades cruzadas para o anti-soro de testosterona (R156/7) são: 100% com testosterona; 57,3% com 5 α -di-hidrotestosterona; 0,2% com androstenediona; 0,4% com androsterona; e <0,04% com outros metabólitos testados (conforme relatado pelo fabricante). Os procedimentos padrão de validação de ensaio incluíram avaliação do paralelismo entre diluições seriadas de amostras de plasma de galos adultos e curvas padrão, recuperação de analito exógeno e relevância biológica dos testes hormonais. Os testes de recuperação foram realizados combinando volumes iguais de plasma de galos e quantidades conhecidas de hormônios exógenos e calculando a diferença entre as concentrações esperadas e observadas de hormônio exógeno ($R^2 = 0,99$). Para avaliar a relevância biológica da testosterona imunorreativa, foram utilizados dados de amostras de plasma de machos e fêmeas adultos de frangos ($138,50 \pm 13,02$ e $32,28 \pm 8,49$ ng/mL, respectivamente $p < 0,05$). Os coeficientes de variação intra e interensaios para dois controles internos (ligações de 20% e 80%) foram de 9,8% e 15,2% respectivamente. A sensibilidade do ensaio (calculada com 90% de ligações) foi de 0,03 ng/mL.

3.2.6. Análise do sêmen

A partir da 18 até a 30 semana de idade, amostras seminais foram coletadas semanalmente utilizando o método da massagem dorso-abdominal (Burrows e Quinn, 1937). A concentração espermática de ejaculados sem contaminação (ou seja, ausência de urato, fezes e sangue) foi imediatamente determinada por espectrofotometria (fotômetro Accuread para galos e perus, IMV, França) e, a concentração final (100×10^6 espermatozoides/mL) foi obtida diluindo cada amostra com solução de Biggers-Whitten-Whittingham (BWW). Após a diluição, a motilidade espermática foi avaliada usando um

Capítulo 1

Hamilton Thorne Versão 12.3k IVOS (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA). Para cada medição, alíquotas de 6 μL de cada amostra de sêmen foram depositadas sob uma lâmina, onde pelo menos 1000 espermatozoides foram examinados para cada amostra utilizando a configuração padrão para galo descrita na tabela 1.

Capítulo 1

Tabela 3 – Configurações utilizadas na análise da cinética espermática de galos

Seção	Parâmetros	Valores
Configurações da análise	Frames por segundo	60 Hz
	Número de frames	30
	Contraste mínimo	25
	Tamanho da célula	5 pixels
	Intensidade da célula	80
	Velocidade média da trajetória (VAP)	50 μ /s
	Retilinearidade (STR)	70%
	Células lentas	Estáticas
	Velocidade média da trajetória mínima	10 μ /s
	Velocidade linear progressiva mínima	20 μ /s
	Configurações óticas	Intensidade
Fotômetro		68
Magnificação		1.89 (10x)
Fonte de vídeo		60 Hz/ campo escuro
Configurações da mesa	Modelo da câmera	Leja 4
	Profundidade da câmera	20 μ m (80 μ m)
	Posição da mesa	A-3.9/ B-11.8/ C-19.7/ D-27.6
	Temperatura	39°C
	Seleção de campos	Automático
	INDENT opção de fluorescência	Não
Configuração dos gráficos	Intensidade dos pontos estáticos	Min – 0.79 / Max. 1.49
	Tamanho dos pontos estáticos	Min. – 0.66 / Max. 4.09
Diluição das amostras		Final (1:1000/ 1:2000)

Fonte: Blank (2020)

A contagem total de espermatozoides foi calculada multiplicando a concentração de espermatozoides pelo volume do ejaculado.

3.2.7. *Processamento dos tecidos*

Imediatamente após a eutanásia, os testículos de pintos de 6 semanas foram coletados, pesados e preparados para análise histológica, imuno-histoquímica e molecular. Para microscopia óptica, os testículos (6 por grupo) foram fixados em

Capítulo 1

paraformaldeído 4% (4° C, 12 h), embebidos em parafina e cortados em secções de 4-5 µm para coloração com hematoxilina-eosina. Para imunofluorescência, os testículos não fixados (10 por grupo) foram lavados três vezes em tampão fosfato-salino (PBS), imersos em composto de OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), rapidamente congelados no vapor de nitrogênio líquido (2 cm acima da superfície) e armazenados a -80° C até o processamento. Em seguida, secções de criostato de 7 µm de espessura foram montadas em lâminas revestidas com silano (StarFrost, Waldemar Knittel, Alemanha) e armazenadas a -20° C até a coloração por imunofluorescência. Os testículos restantes (8 a 14 testículos / grupo, dependendo das perdas de animais durante o tratamento) foram lavados três vezes em PBS, cortados em pedaços pequenos e submersos em solução estabilizadora de RNA (BioAgency, Brasil) por 48 horas antes do congelamento. As amostras foram armazenadas a -20° C até a extração do RNA (dentro de um mês; verificar método na seção 2.10). Em relação aos galos com 30 semanas de idade, os testículos foram excisados logo após a eutanásia e preparados para histologia e imuno-histoquímica (2 e 8 testículos / grupo, respectivamente) usando protocolos de processamento semelhantes.

3.2.8. Análise histológica

As secções coradas foram analisadas em microscopia de campo claro para medir o diâmetro tubular (pelo menos 50 túbulos seminíferos por secção - Microscope Software Zen 2 core, ZEISS, Alemanha) e avaliar alterações histológicas no parênquima testicular. As alterações nos túbulos foram classificadas em quatro escores (Escore I: maior dano ao Escore IV: normalidade total). Escore I: ausência completa de células de Sertoli e células germinativas no interior dos túbulos; Escore II: presença apenas de células de Sertoli (contendo ou não anormalidades - por exemplo, degeneração vacuolar, sangramento,

Capítulo 1

etc.); Escore III: presença de células de Sertoli normais e células germinativas anormais; e escore IV: presença de células de Sertoli e células germinativas sem alterações morfológicas.

3.2.9. *Imunofluorescência para a detecção de células pluripotentes*

As lâminas foram removidas de -20° C e subsequentemente fixadas em paraformaldeído 4% gelado (PFA) por 10 min. As secções foram enxaguadas três vezes em Tween PBS 0,5% (TTBS) e incubadas com anti-soro contra o Nanog de frango (cNanog; 1: 500; [33]) por 2 h a 37° C. Após incubação com anticorpo primário, as lâminas foram enxaguadas com TTBS três vezes (5 min cada), as secções foram incubadas com Alexa Fluor 488 de cabra anti-coelho (1: 500; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 1 h a 37° C. Após incubação com anticorpo secundário, as secções foram lavadas três vezes com TTBS (5 min cada), coradas com DAPI por 5 min (1: 1000; solução DAPI 1 mg / mL, Invitrogen). Após a marcação nuclear, as secções foram novamente lavadas três vezes com TPPB (5 min cada) e montadas com meio anti-desbotamento (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As imagens foram obtidas usando um microscópio de epifluorescência (Olympus BX-60) com uma combinação de filtros de excitação e emissão a 488/650 nm, equipado com um Zeiss AxioCam HRc. Como controles positivos, utilizamos embriões de galinha recém-postos (EGK estágio X - Eyal-Giladi e Kochav, 1976) e gônadas de embriões com 5.5 dias de incubação (estágio 25HH), que foram lavados em solução de Pannett Compton e fixados em solução de sacarose / PFA (20% de sacarose p / v em PFA 4%) durante a noite a 4° C (Anexo A). Os embriões fixados foram preparados, seccionados e corados usando o mesmo protocolo descrito acima. Para os controles negativos, o anti-soro primário foi omitido.

3.2.10. Extração de RNA

Os testículos congelados armazenados em solução estabilizadora de RNA foram pulverizados usando um pilão e almofariz pré-resfriado em nitrogênio líquido e, em seguida, o RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol® (Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (Anexo B). A concentração de RNA (ng / µl) foi determinada com o espectrofotômetro ND-1000 a 260 nm (NanoDrop®, Thermo Scientific). Apenas RNAs puros (razão de 260/280 nm em torno de 2,0) foram empregados para a síntese de cDNA.

3.2.11. RT-qPCR

Para investigar a diminuições de células germinativas endógenas após o tratamento com bussulfano, a expressão de pluripotência, células germinativas primordiais (PGC) e marcadores de células-tronco espermatogonais (SSC) foram examinadas por PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) com amostras de cDNA preparadas a partir de testículos de galos. Paralelamente, marcadores pró e anti-apoptóticos foram avaliados para monitorar a morte celular no parênquima testicular. Os genes alvo foram *ch-c-Myc*, *ch-Nanog*, *ch-GFRa1*, *ch-Bid* e *ch-Bcl-2*, enquanto o *ch-GAPDH* foi adotado como gene de referência. O cDNA foi obtido usando amostras de RNA (1 µg por reação) e SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA), conforme recomendado pelo fabricante (Anexo C). A padronização dos iniciadores mostrou que as sequências oligonucleotídicas selecionadas eram eficientes para amplificação por RT-qPCR. Os *primers* utilizados para a transcrição de interesse foram projetados pelo programa de computador Primer Express® Software versão 3.0 (Applied Biosystems) ou retirados da literatura (Tabela 2).

Capítulo 1

Tabela 4 – Iniciadores padronizados para quantificação de células testiculares que expressam genes marcadores de pluripotência, células germinativas primordiais, células-tronco espermatogoniais, apoptose e anti-apoptose.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
<i>ch-GAPDH</i> * (gene endógeno)	Sense primer	CATCGTGCACCACCAACTG
	Antisense primer	CGCTGGGATGAT GTTCTGG
<i>ch-Nanog</i> ** (marcador de célula germinativa primordial)	Sense primer	CAGCAGACCTCTCCTTGACC
	Antisense primer	TTCCTTGTCCCACTCTCACC
<i>ch-c-Myc</i> *** (Marcador de pluripotência)	Sense primer	TTCCATCGGTCAGGACACAG
	Antisense primer	TCATTACGCCTCTGACGCTC
<i>ch-GFRα</i> * (marcador de espermatogônia)	Sense primer	GAGGCGGCAGACTATTGTTC
	Antisense primer	GGAGGCAGTCAGCGTAGTTC
<i>ch-Bid</i> (marcador de apoptose)	Sense primer	AGCTTGCTGAGATCGGAGAC
	Antisense primer	GGCACCGTGTTATCTCCTCT
<i>ch-Bcl2</i> (marcador de anti-apoptose)	Sense primer	AGGATGGGATGCCTTTGTGGA
	Antisense primer	CAGGCTCAGGATGGTCTTCAG

*Mucksová et al. 2013/ **Cañón et al., 2006; Laval et al. 2007/ ***Yu et al. 2013.
Fonte: Blank (2020).

O reagente Fast SYBR® Green Dye (Life Technologies) e o sistema ViiA7 Real Time PCR (Life Technologies) foram utilizados para quantificação do produto nas seguintes condições: 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95° C por 1 segundo e 60° C por 20 segundos. Um ciclo de dissociação foi realizado após cada execução para verificar a amplificação ou contaminação inespecífica. A análise foi realizada conforme citado em Lobba et al., 2012.

3.2.12. Preparo dos galos receptoras

O preparo das aves receptoras foi realizado conforme método previamente descrito no item 2.3 utilizando a concentração de 20 mg/kg de bussulfano. A escolha da

concentração de bussulfano foi fundamentada de acordo com os resultados obtidos ao final do estudo sobre a depleção de células germinativas.

3.2.13. *Dispersão e criopreservação de células testiculares*

Após a eutanásia, os testículos de codornas foram imediatamente removidos e lavados em PBS por 3 vezes. O protocolo para dispersão e criopreservação das células testiculares foi realizado como descrito por Guan et al. (2009). As células foram recuperadas a partir de 2-3 gramas de tecido testicular finamente cortados em fragmentos de 1 – 2 mm. Esses fragmentos foram incubados (37°C, 5% CO₂) com 1mg/ mL de colagenase IV (Sigma, EUA) em 4 mL de meio Waymouth (Invitrogen, EUA) por 20 min. e dispersos por pipetagem. A suspensão resultante foi então centrifugada (200g, 5 min) para retirada do meio, lavada em PBS (10 mL) 3 vezes, e incubada em 4 mL de solução de tripsina/EDTA (0,05% e 0,5 mM, respectivamente) por 5 min (37°C, 5% CO₂). Após a o período de incubação, a reação foi inativada (20% soro fetal bovino), filtrada (cell strainer 70 µm, BD Biosciences), lavada em PBS e, centrifugada (450g, 5 min). A suspensão de células foi reconstituída vagarosamente em meio DMEM (Dulbelcco's Modified Eagle's Medium; Invitrogen, EUA) suplementado com 20% soro fetal bovino, 8% de DMSO (Dimetilsulfóxido; Sigma, EUA) e, 1% de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL; Thermo Fisher Scientific, EUA) com concentração de 5 x 10⁶ células/ mL. Posteriormente, a suspensão foi transferida para criotubos de polipropileno estéreis (2 mL) condicionados em um container de congelação (Nalgene® Mr. Frosty; Thermo Fisher Scientific, EUA) e mantidos em freezer –80° C por 12 horas. No dia seguinte, os criotubos foram transferidos para um botijão de nitrogênio líquido (–196° C). Para o descongelamento, os criotubos foram imersos em banho maria a 37° C por 2 min e, imediatamente, o meio de criopreservação foi removido através da adição de

Capítulo 1

10 mL de DMEM pré-aquecido (37° C) seguindo uma etapa de centrifugação (450g, 5 min). Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado utilizando meio DMEM pré-aquecido (37° C).

3.2.14. Plaqueamento e seleção de espermatozônias

Após o descongelamento, a suspensão de células foi submetida ao método de plaqueamento em laminina (Sigma, EUA) segundo Guan et al. (2009) para a seleção da fração de espermatozônias. Placas previamente revestidas com laminina (incubação overnight, 37° C, 5% CO₂ com 3 mL de solução de laminina 20 µg/ mL) foram enxaguadas gentilmente com PBS (3x) e incubadas por 1 h com 3 mL de albumina sérica bovina (BSA, 0,5 mg/ mL). Após a incubação, as placas foram enxaguadas gentilmente com PBS (3x) e 2 mL da suspensão de células testiculares (10 x 10⁶ células) foram adicionados e incubados por 15 min (37° C, 5% CO₂). A fração de células não-aderidas a placa foi removida através da lavagem com PBS (3x). As células aderidas foram removidas com tripsina/EDTA (0,05% e 0,5 mM, respectivamente), lavadas com PBS (1x), filtradas (cell strainer 70 µm, BD Biosciences), centrifugadas (450g por 5 min) e, resuspensionada em meio DMEM até a concentração desejada.

3.2.15. Transplante de células germinativas testiculares

Para a realização dos transplantes todos os animais foram submetidos a anestesia geral inalatória com isoflurano (indução 3-5%; manutenção 1,5-2,5%). O acesso aos testículos foi efetuado por meio de uma pequena incisão (1 cm) na região lateral logo após a última costela. Após a visualização dos testículos, os machos receptores (frangos de 9 semanas) receberam através de uma micro-seringa analítica de cromatografia

Capítulo 1

(Hamilton®) 50 µL da suspensão de espermatogônias (aproximadamente 0.3×10^6 /testículo). A sutura da pele foi feita com fio monoylon (4.0 a 6.0) e o tratamento pós-cirúrgico foi realizado com anti-inflamatório/analgésico/antibiótico (0,3 mg/ kg meloxicam, 0,1 mg/ kg tramadol, 0,5 mg/ kg dipirona, 5 mg/ kg enrofloxacin, respectivamente) por 5 dias.

3.2.16. *Imunohistoquímica para a detecção de células da espécie doadora*

Logo após a eutanásia, os testículos de cada receptor (galos com 31 semanas) foram coletados, lavados 3 vezes com PBS, e fixados por 12 horas com PFA 4%. As gônadas foram então embebidas em parafina e submetidas a cortes seriados de 5 µm de espessura. A detecção das células doadoras nos animais receptores foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal QCPN (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), que reconhece antígenos nucleares específicos de células de codorna Douarin et al., 2008), ao passo que a imunomarcação foi realizada pelo método de cadeia polimérica conjugada (HRP-DAB, Dako). Em seguida, cada lâmina foi contra corada com hematoxilina de Harris e verificada a presença ou ausência de células de codorna imunomarcadas (Anexo D). Simultaneamente, secções de codorna e galo não-transplantados foram imunomarcados e utilizados como controle positivo e negativo para cada ensaio realizado.

3.2.17. *Extração do DNA genômico testicular das aves receptoras*

Os testículos armazenados em freezer -80° C pulverizados usando um pilão e almofariz pré-resfriado em nitrogênio líquido e, em seguida, o DNA genômico foi extraído usando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Quiagen, Netherlands) de acordo com

Capítulo 1

as instruções do fabricante (Anexo E). A concentração de DNA (ng / μ l) foi determinada com o espectrofotômetro ND-1000 a 260 nm (NanoDrop®, Thermo Scientific). Apenas cDNAs puros (razão de 260/280 nm em torno de 2,0) foram empregados para as reações de PCR

3.2.18. Detecção do DNA genômico de codorna

A confirmação da presença de células germinativas de codorna nos testículos dos galos receptores foi testada por Nested-PCR. A detecção do DNA genômico de codorna foi testado utilizando primers para a amplificação do DNA da ovalbumina (GenBank No. XP_015709964) e, DNA mitocondrial (GenBank No. AP_003195) (Tabela 5).

Tabela 5 – Iniciadores utilizados na detecção de DNA genômico de codorna em testículos de galos receptores.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
<i>Ovalbumina</i> (Pereira et al., 2013; Soh et al., 2004)	Primer Externo (Sense)	CAGAGGCTGGAGTGGATGCTA
	Primer Externo (Antisense)	TATTACTCTGTGTAAGGGAAGGGTGAAGT
	Primer Interno (Sense)	GGGCTGACCATCCATTCCTC
	Primer Interno (Antisense)	GTCTGGATGCAGCAGAGAACATGC
	Primer Interno (Sense)	CTCTTTATACTTTCTTCTTTTTAAGGGG
	Primer Externo (Antisense)	TCCTAGATAAAGCCCTAACTTTTATA
<i>Mitocondria</i> (Roe et al., 2013)	Primer Externo (Sense)	CCACGATCTACCCAACCACC
	Primer Externo (Antisense)	GTTGGTTGGGCTAGAGGTAGGG
	Primer Interno (Sense)	CGTCACCCTCTTCAAAGCTAC
	Primer Interno (Antisense)	GCTTTGGAGCTTATAGCTACGC

Fonte: Blank (2020)

Capítulo 1

O DNA genômico proveniente de testículos de codorna e galos não-transplantados adultos foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O protocolo de amplificação deste Nested-PCR consistiu em desnaturação inicial a 95° C por 10 min, ciclos de amplificação (95° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos) e extensão final a 72° C por 10 min, sendo 20 ciclos para a primeira etapa (outer primer) e 30 ciclos para a segunda etapa (inner primer). Os produtos gerados pelos PCRs foram submetidos a eletroforese (150 min, 120 V) em gel de agarose 1,5%.

3.2.19. Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média \pm erro-padrão. Todas as variáveis foram inicialmente testadas para determinar a homogeneidade das variâncias e normalidade dos dados e, por conseguinte, os dados que não obedeceram essas premissas foram transformados (log10). Os efeitos dos tratamentos sobre o peso corporal médio, hematócrito, índice gonadossomático (GSI), diâmetro tubular, escore tubular e expressões de mRNA foram analisados usando ANOVA seguido pelo teste de Dunnet'. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS System para Windows 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), com um nível de significância de $P < 0,05$ para todos os testes.

3.3. RESULTADOS

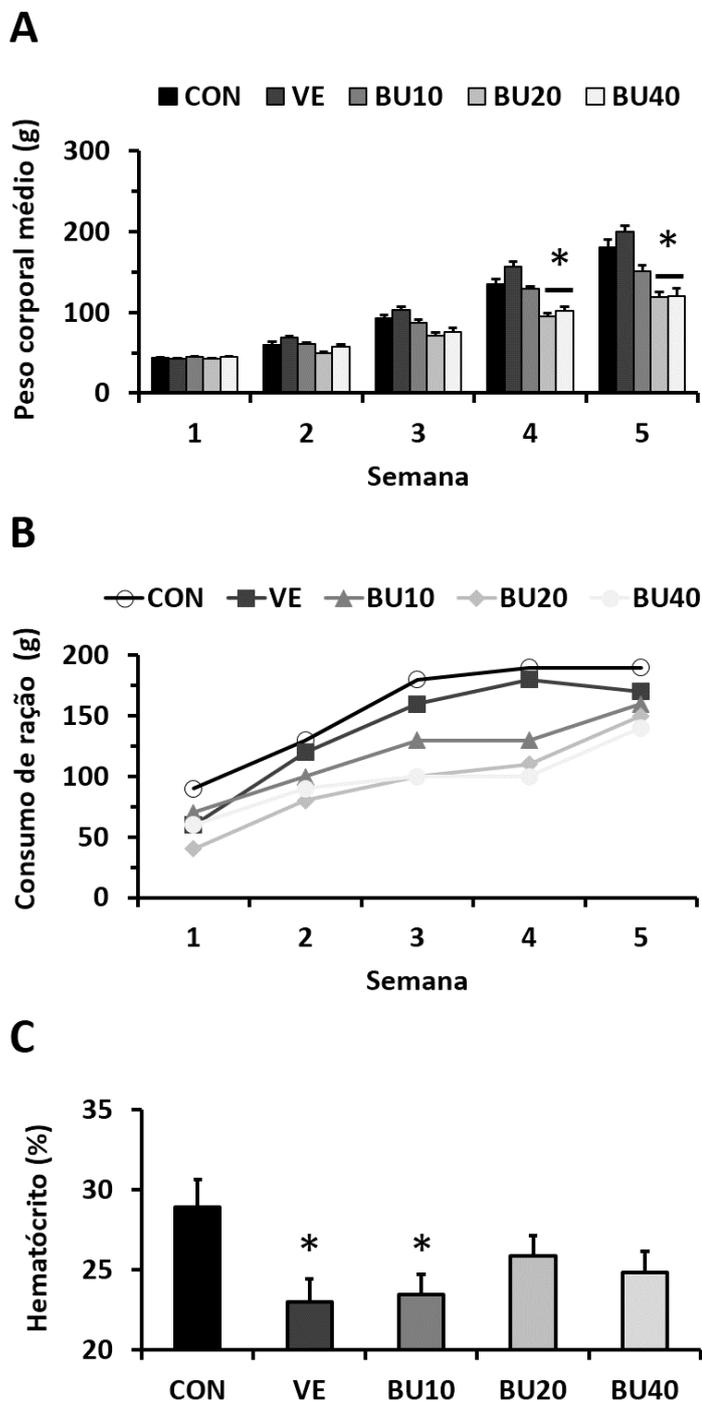
Todas as mortes registradas em nosso estudo (9 de 100 aves) ocorreram dentro de 7 dias após a primeira aplicação, possivelmente devido a injeções incorretas das soluções no intestino que resultaram em necrose intestinal (confirmada na necropsia). Nesta primeira semana, a taxa de mortalidade nos grupos VE, Bu10, Bu20 e Bu40 foi de 10, 5,

Capítulo 1

10 e 20%, respectivamente, mas nenhuma outra perda foi documentada após esse incidente. Embora os pesos corporais nos grupos Bu20 e Bu40 tenham sido significativamente menores que os controles durante a quarta e quinta semana de tratamento ($P < 0,05$), as diferenças no peso corporal médio entre os tratamentos com bussulfano e os controles após cinco semanas de tratamento não foram significativas ($P > 0,05$ – Figura 1A). A ingestão média de ração também não mostrou diferenças entre os grupos no final do tratamento ($P > 0,05$ – Figura 1B). Além disso, testes de hematócrito revelaram que apenas os tratamentos VE e Bu10 diminuíram consideravelmente suas concentrações de glóbulos vermelhos ($P < 0,05$ – Figura 1C).

Capítulo 1

Figura 3 - Progressão semanal do (A) peso corporal e (B) consumo de ração de pintos de um dia de idade tratados com doses fracionadas de bussulfano durante as primeiras cinco semanas de vida. (C) Efeitos do tratamento com bussulfano no hematócrito de pintos de 6 semanas após quimioterapia. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (COM $P < 0,05$). Injeção de veículo (VE - N, N-dimetilformamida + água destilada), injeções de bussulfano nas concentrações de 10, 20 e 40 mg / kg (grupos BU10, BU20 e BU40, respectivamente).



Fonte: Blank (2020)

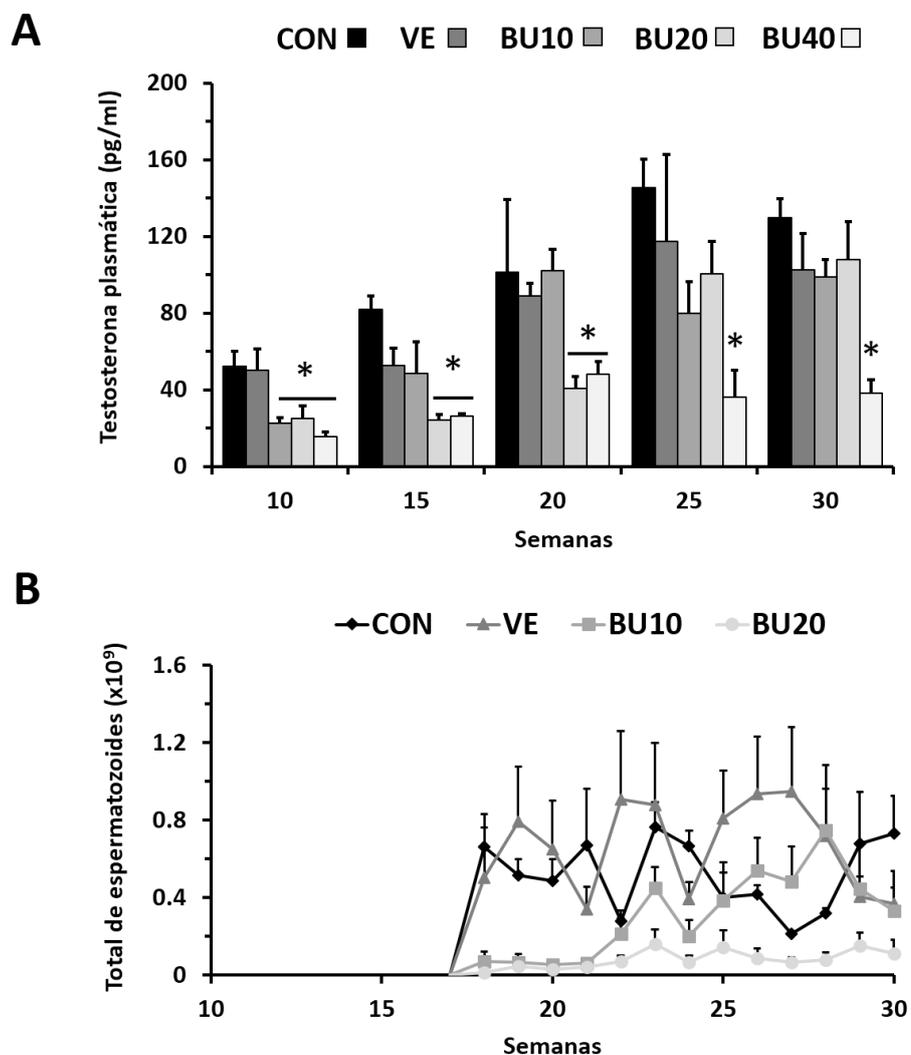
Às 10 semanas de idade, os níveis de testosterona em todos os galos tratados eram inferiores aos controles e VE, independentemente da dose de bussulfano ($P < 0,05$ –

Capítulo 1

Figura 2A). Posteriormente, indivíduos do Bu10 e Bu20 aparentemente restauraram sua atividade androgênica às 15 e 25 semanas de idade, respectivamente, enquanto o Bu40 permaneceu em níveis baixos ao longo deste estudo. Paralelamente, a produção de espermatozoides no Bu10 recuperou-se para os níveis de controle e VE às 23 semanas de idade; enquanto Bu20 produziu contagens marginais de espermatozoides durante o período de monitoramento ($0,01-0,15 \times 10^9$ espermatozoides por ejaculado – Figura. 2B). Galos submetidos à dose mais elevada de busulfano (Bu40) não conseguiu produzir esperma de 18 a 30 semanas de idade. Os parâmetros de motilidade dos espermatozoides produzidos pelos galos tratados com bussulfano foram semelhantes aos observados nos controles e VE.

Capítulo 1

Figura 4 - (A) Níveis plasmáticos de testosterona e (B) produção de esperma de galos tratados com doses fracionadas de bussulfano durante as primeiras cinco semanas de vida. Os dados são relatados como média \pm erro-padrão. Galos submetidos à dose mais elevada de bussulfano (Bu40) não conseguiram produzir espermatozoides entre 18 a 30 semanas de idade. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (CON - $P < 0,05$). Injeção de veículo (VE - N, N-dimetilformamida + água destilada), injeções de bussulfano nas concentrações de 10, 20 e 40 mg / kg (grupos Bu10, Bu20 e Bu40, respectivamente).



Fonte: Blank (2020)

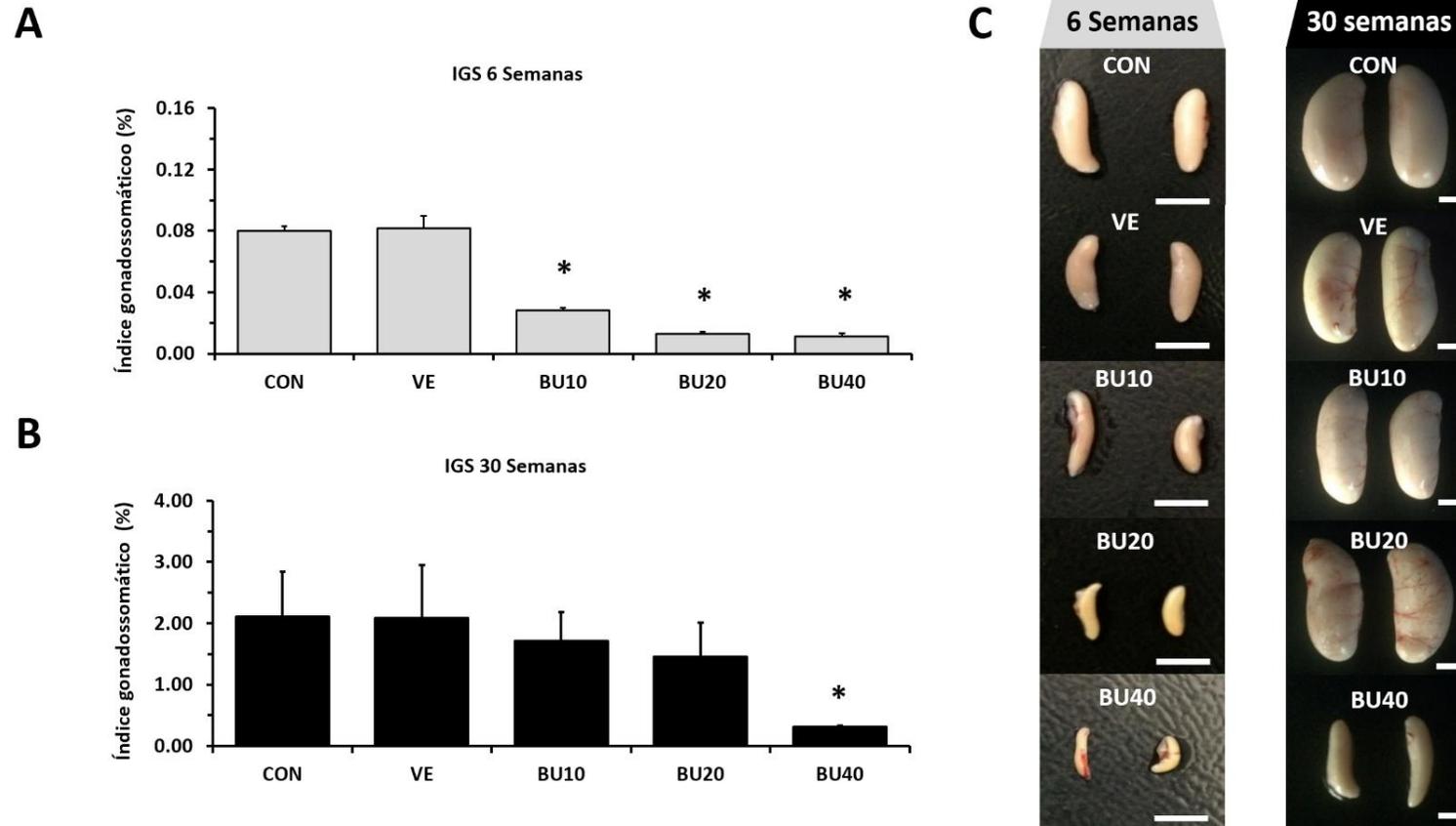
Doses crescentes de bussulfano levaram a declínios graduais no IGS de pintos com 6 semanas de idade, implicando supressão da espermatogênese endógena ($P < 0,05$ – Figura 3A e C). No entanto, os efeitos do bussulfano no peso dos testículos não parecem durar até 30 semanas de idade, exceto o Bu40, que demonstrou uma diminuição de sete vezes no IGS quando comparado aos controles ($P < 0,05$ – Figura 3B e C). Além disso,

Capítulo 1

em idades mais altas, as injeções de bussulfano a 20 mg/kg resultaram em uma ampla gama de massas gonadais variando de 0,23 a 2,29%.

Capítulo 1

Figura 5 - Índice gonadosomático (GSI) de pintos tratados com doses fracionadas de bussulfano durante as primeiras cinco semanas de vida. (A e B) Valores médios de GSI (\pm EP) de indivíduos de diferentes grupos às 6 e 30 semanas de idade, respectivamente. (C) Comparação macroscópica de testículos de galos dos grupos controle (CON), veículo (VE - N, N-dimetilformamida + água destilada) e bussulfano (Bu10, Bu20 e Bu40) às 6 e 30 semanas de idade. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (CON - $P < 0,05$). As barras de escala representam 1 cm.



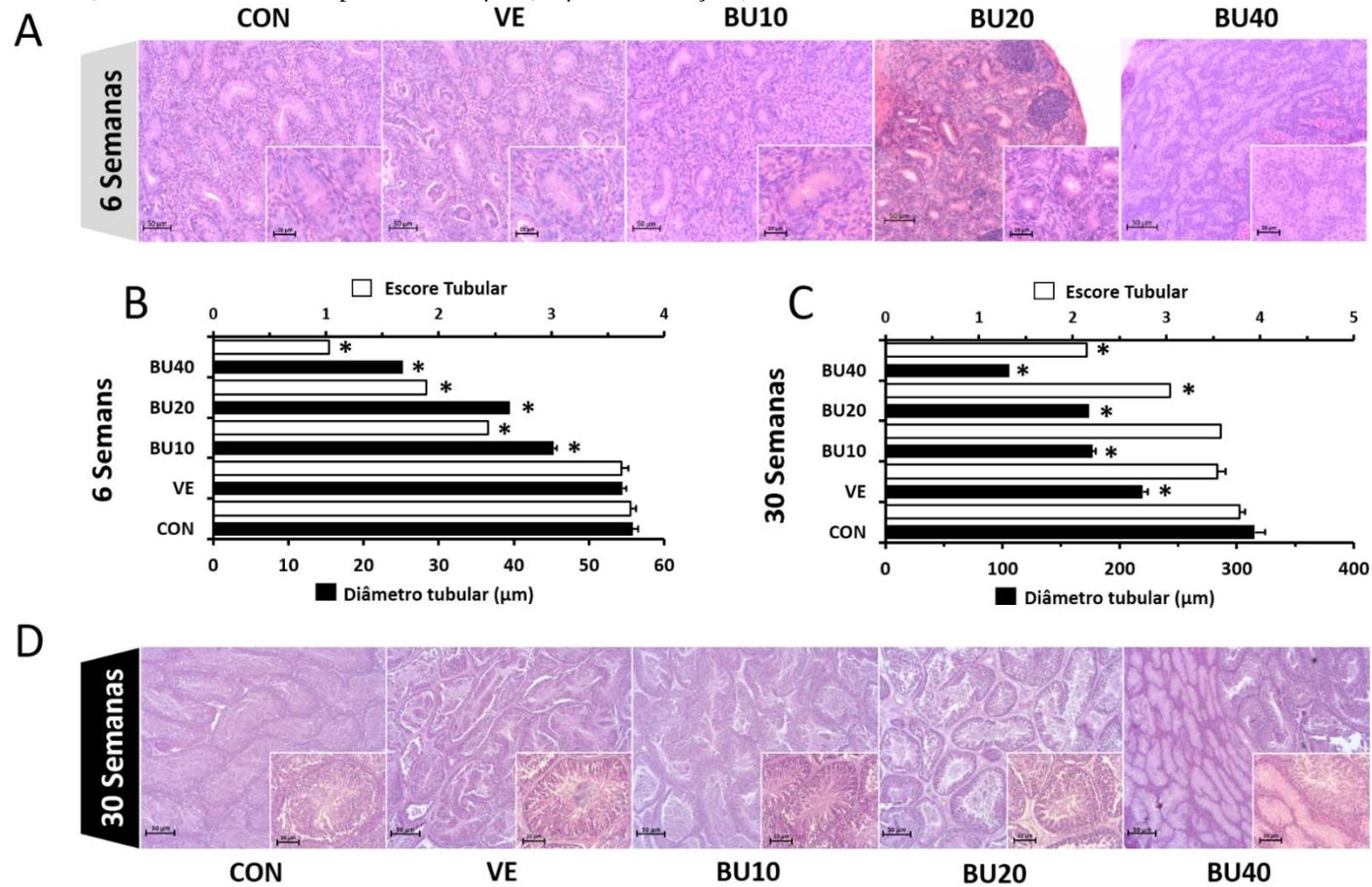
Fonte: Blank (2020).

Capítulo 1

Paralelamente, a histologia dos testículos confirmou uma redução dependente da dose no diâmetro dos túbulos seminíferos às 6 semanas de idade ($P < 0,05$), com alterações no epitélio que variaram entre discretas diminuições numéricas das células germinativas nas secções transversais dos túbulos (Bu10) a extensa perda de células no interior dos túbulos (observada principalmente em Bu40) (Figura 4A). Esses distúrbios também foram detectados pelo nosso sistema de classificação, uma vez que os grupos Bu10, Bu20 e Bu40 apresentaram escores tubulares médios mais baixos do que os grupos CON e VE ($P < 0,05$) (Figura 4B). Às 30 semanas de idade, as reduções no diâmetro tubular ainda eram visíveis em todas as doses de bussulfano, embora mudanças significativas no escore tubular fossem percebidas apenas em galos tratados com 20 e 40 mg / kg (Bu20 e Bu40 - Figura 4C e D)

Capítulo 1

Figura 6 - Análise histológica do parênquima testicular em pintos controle e tratados com bussulfano. (A) Micrografias das secções testiculares de pintos de 6 semanas nos grupos controle (CON) e tratados com veículo (VE) e bussulfano (Bu10, Bu20 e Bu40 correspondem a doses de 10, 20 e 40 mg / kg) (H&E 200X; Inserções 400X). (B) e (C) diâmetro tubular seminífero médio (\pm EP) e escore nos grupos experimentais às 6 e 30 semanas de idade, respectivamente. (D) Micrografias das seções de testículos de galos de 30 semanas nos grupos controle, veículo e tratados com bussulfano (H&E 200X; Insets 400X). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (CON - $P < 0,05$). As barras de escala representam 50 μ m (20 μ m em inserções).



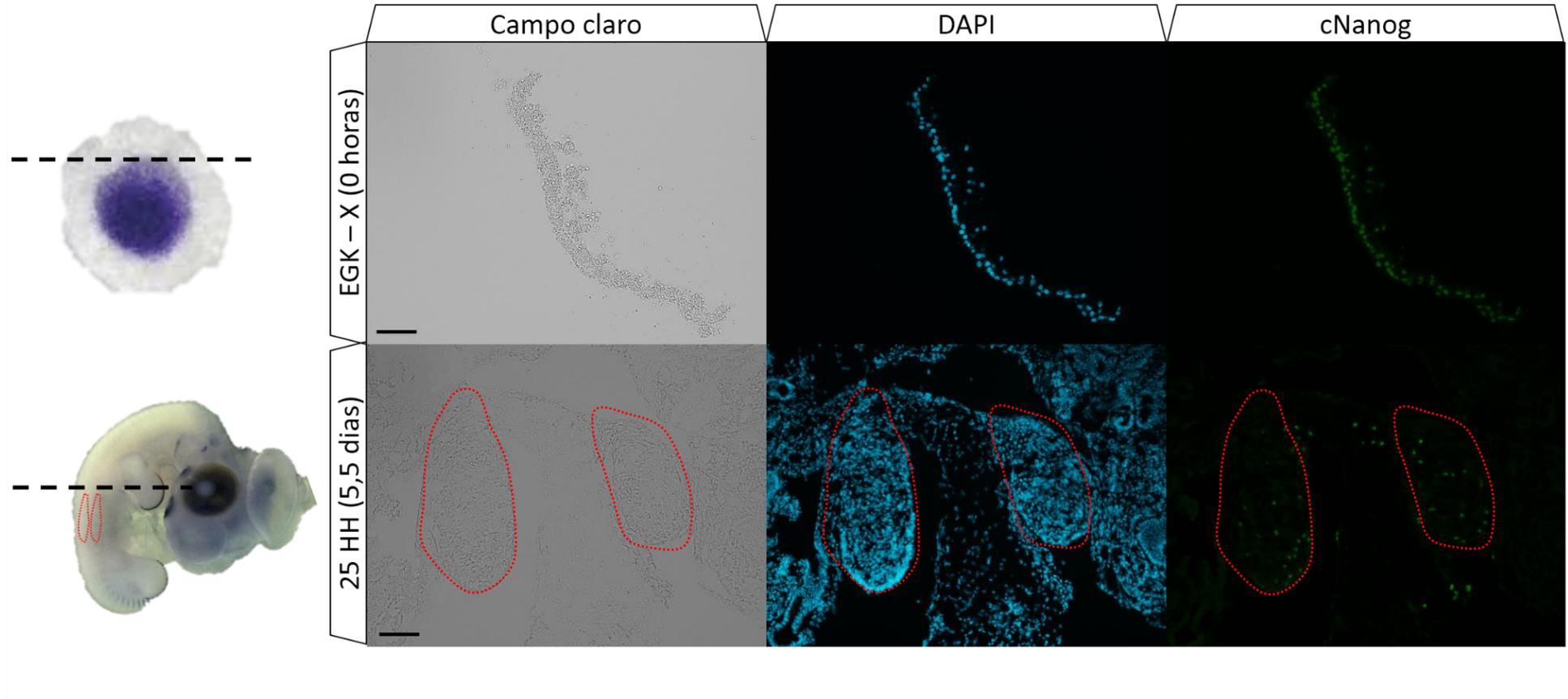
Fonte: Blank (2020)

Capítulo 1

A imunofluorescência revelou que a proteína cNANOG foi detectada na região nuclear de células blastodermais de embriões de estágio X-EGK e em células germinativas das gônadas primordiais de embriões em estágio 25 HH (usados como controles positivos Figura 5), enquanto a proteína cNANOG passou a ser detectada no citoplasma de células germinativas dos túbulos seminíferos de pintos tratados com controle e veículo. No entanto, o número de células testiculares que expressam cNANOG caiu drasticamente em pintos tratados com bussulfano a 10 mg/kg (Bu10), ao passo que uma redução ainda maior de células coradas para cNANOG foi observada em secções de pintos tratados com Bu20. A expressão de cNANOG não foi encontrada em nenhuma das secções testiculares do grupo Bu40 (Figura 6).

Capítulo 1

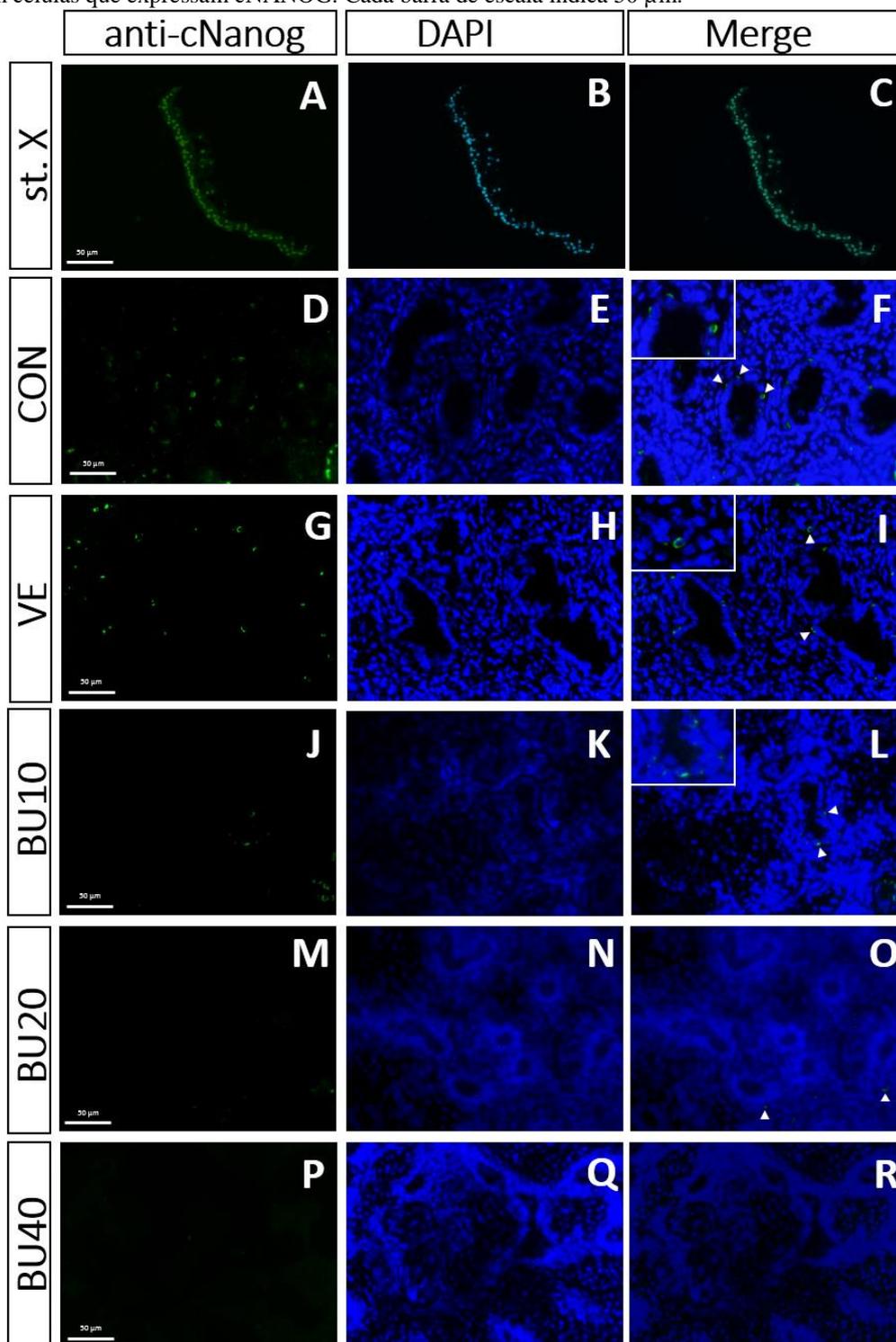
Figura 7 - Análise das criosecções coradas por imunofluorescência com anti-soro anti-cNanog utilizando embriões de galinha no estágio EGK-X (embriões coletados de ovos recém ovipostos) e gônadas primordiais de embriões com 5,5 dias (estágio 25 HH). As linhas tracejadas (pretas) indicam o sentido do corte, enquanto as vermelhas indicam a posição das gônadas primordiais. As barras de escala representam 500 μ m.



Fonte: Blank (2020)

Capítulo 1

Figura 8 - Criosseções coradas por imunofluorescência do parênquima testicular de pintos controle e tratados com bussulfano usando anti-soro anti-cNanog. (A - C) Expressão de cNANOG em núcleos de algumas células em embriões de galinha EGK estágio X (st. X - usado como controle positivo). (D - G) Seções de testículos de pintos de 6 semanas dos grupos controle e veículo (CON e VE, respectivamente) mostrando expressão citoplasmática de cNANOG em muitas células germinativas. (J - L) Redução acentuada de células germinativas que expressam cNANOG nos testículos de pintos tratados com bussulfano a 10 mg / kg (Bu10). (M - O) Pouquíssimas células expressaram cNANOG em seções testiculares de pintos tratados com bussulfano a 20 mg / kg (Bu20). (P - R) Não foi detectada expressão de cNANOG em pintos tratados com bussulfano a 40 mg / kg (Bu40). As setas brancas representam células que expressam cNANOG. Cada barra de escala indica 50 μ m.

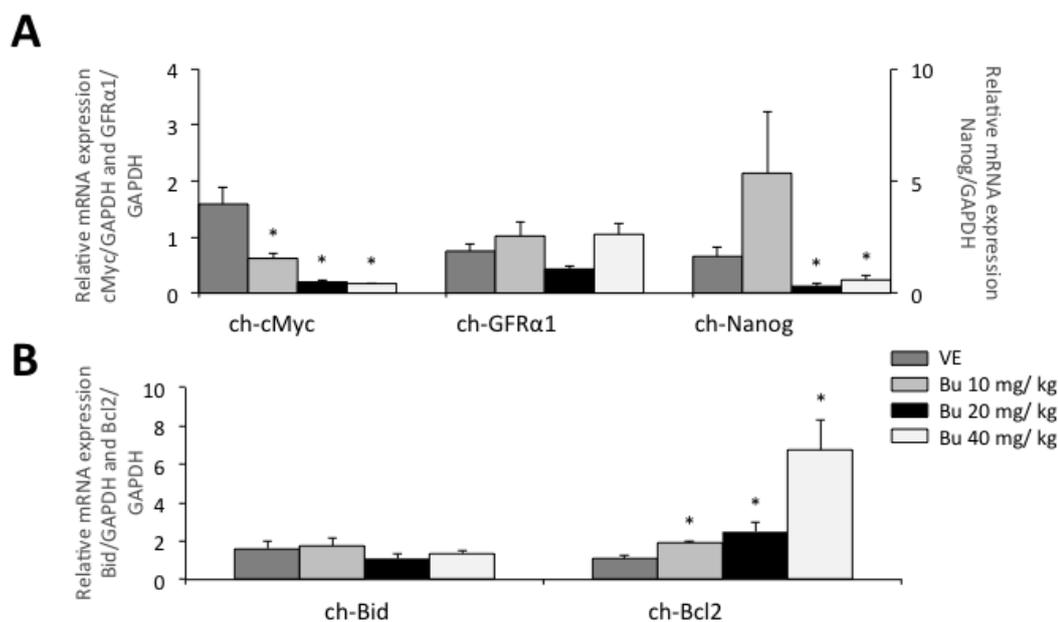


Fonte: Blank (2020)

O RT-qPCR foi realizado nos testículos no final do tratamento para estimar a eficácia de doses fracionadas de bussulfano na redução de células germinativas endógenas (Figura 6). Todos os grupos busulfano expressaram níveis mais baixos de ch-c-Myc em comparação ao grupo VE ($P < 0,05$), embora a expressão desse gene na Bu10 tenha sido consideravelmente maior do que nos grupos Bu20 e Bu 40 ($P < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos quanto aos níveis de expressão de ch-GFR α 1 ($P > 0,05$), enquanto a expressão de ch-Nanog, quando comparada à VE ($P < 0,05$), enquanto foi expressa em níveis muito mais baixos em Bu20 e Bu40 (5- e 3 vezes menos, respectivamente, $P < 0,05$). Os níveis de expressão de ch-Bid foram aproximadamente iguais para todos os grupos ($P > 0,05$). Aumentos dependentes da dose nos níveis de expressão de ch-Bcl2 foram detectados nos grupos Bu10 e Bu20 exibindo aumentos intermediários (1,7 e 2,3 vezes, respectivamente) em comparação com VE, e Bu40 cujos níveis de expressão foram marcadamente mais altos (6,1 vezes) ($P < 0,05$).

Capítulo 1

Figura 9 - Expressão relativa de mRNA de genes para pluripotência (ch-c-Myc), células germinativas primordiais (ch-Nanog), células-tronco espermatogonais (ch-GFR α 1), apoptose (ch-Bid) e anti-apoptose (ch-Bcl-2) em testículos de pintos de 6 semanas tratados com doses fracionadas de bussulfano. Os valores (A) são expressos como unidades arbitrárias de mRNA ch-c-Myc, CH-GFR α 1 e Nanog normalizados contra os níveis de expressão de GAPDH amplificados a partir do mesmo molde, em relação à expressão observada em controles. (B) Os valores são expressos como unidades arbitrárias de mRNA de ch-Bid e ch-Bcl-2 normalizadas contra os níveis de expressão de GAPDH amplificados a partir do mesmo molde, em relação à expressão observada nos controles. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (CON - $P < 0,05$). Injeção de veículo (VE - N, N-dimetilformamida + água destilada), injeções de bussulfano nas concentrações de 10, 20 e 40 mg / kg (grupos Bu10, Bu20 e Bu40, respectivamente).

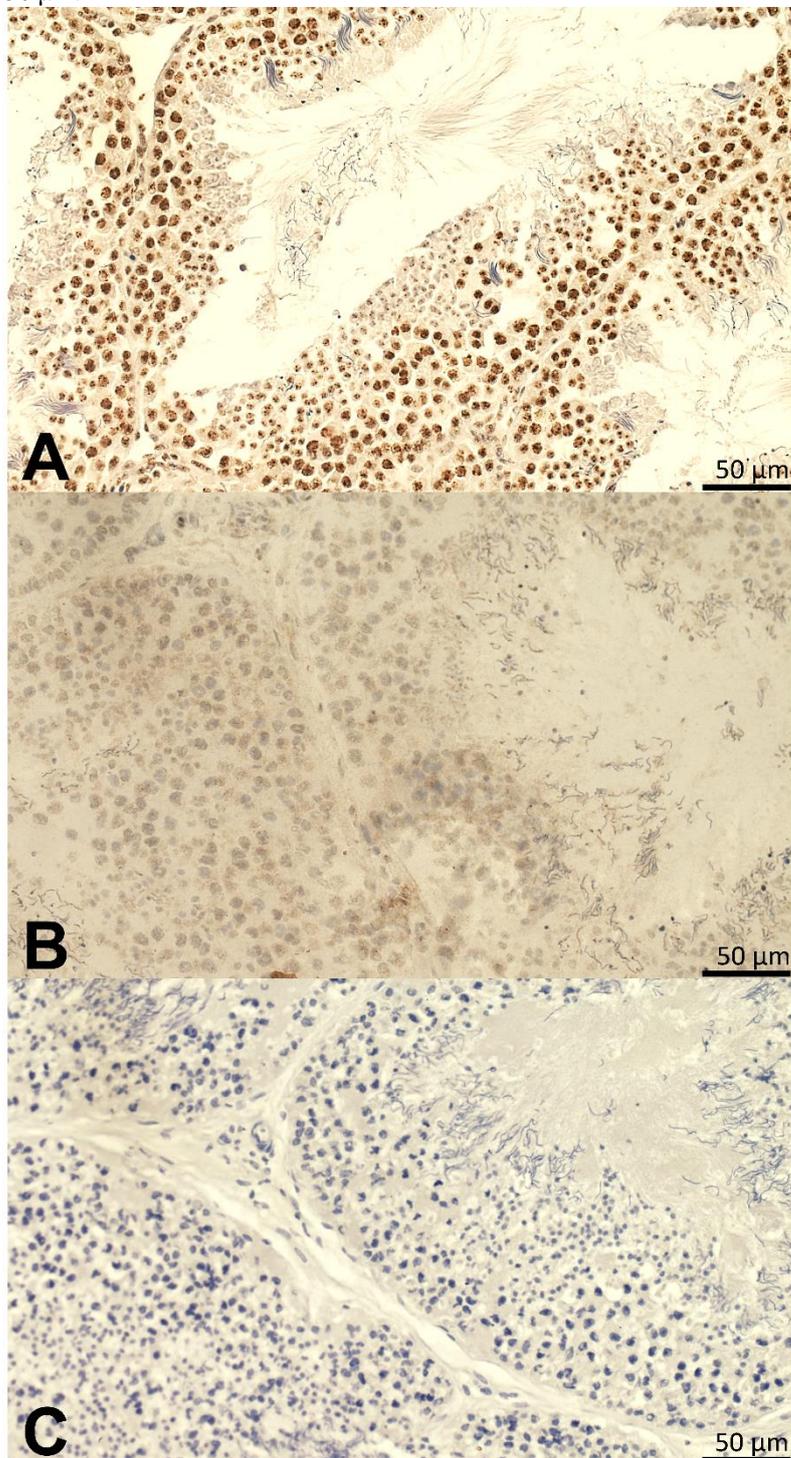


Fonte: Blank (2020)

A imunohistoquímica do parênquima testicular de galos depletados com 20 mg/kg de bussulfano revelou a detecção da proteína QCPN na região nuclear de células germinativas nos túbulos seminíferos (Figura 8B). No entanto, foi possível observar que a intensidade da expressão da proteína (QCPN) nos testículos das aves transplantadas não foi tão intensa quanto à observada em controles positivo (testículo de codorna – Figura 8A). Seis meses após o transplante, células germinativas de doadores foram encontradas em 21,43% dos recipientes (3/14) utilizados. Na maioria dos túbulos com marcação positiva, as células germinativas de codornizes proliferaram para formar cadeias de células conectadas localizadas próximas à membrana basal. Contudo, houveram alguns poucos túbulos seminíferos cuja marcação do anticorpo QCPN foi encontrada em vários estágios espermatogênicos (p.e. espermatogônias e espermatócitos I e II), a exceção de espermátides e espermatozoides.

Capítulo 1

Figura 10 - Secções coradas por imunohistoquímica do parênquima testicular de codorna e galos controle e transplantados com espermatogônias de codorna usando anti-soro anti-QCPN. (A) Expressão de QCPN em núcleos de células testiculares de codorna. (B) Secção de testículo de galo transplantado com espermatogonias de codorna mostrando a expressão nuclear de QCPN tanto em células germinativas quanto em células somáticas. (C) Secção de testículo de galo controle (não transplantado) mostrando a completa ausência de expressão de QCPN. Cada barra de escala indica 50 μ m.

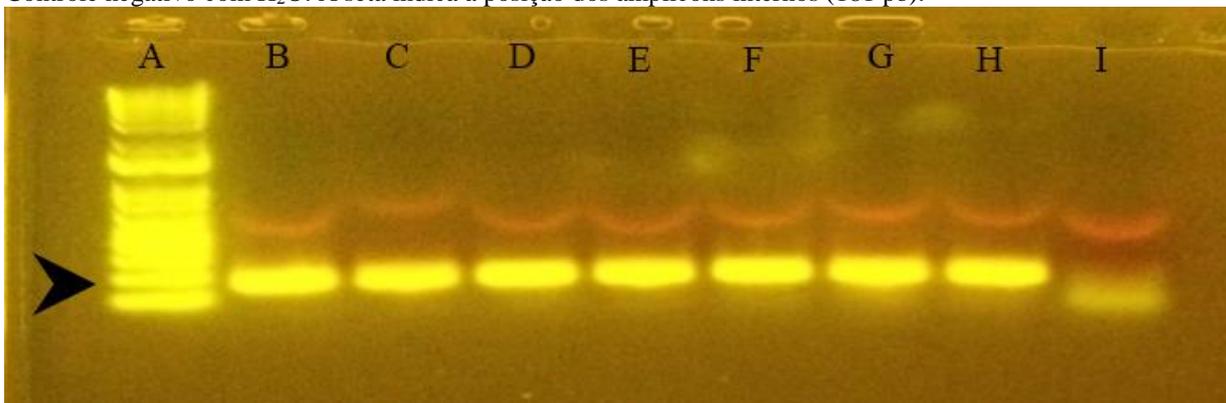


Fonte: Blank (2020)

Capítulo 1

Com relação as análises genéticas, não foi possível detectar em nenhuma amostra DNA genômico de codorna. Estranhamente, os primers utilizados (os quais já foram anteriormente citados em publicações científicas prévias) não apresentaram a sensibilidade e a especificidade desejada. Além disso, a presença de amplificação inespecífica de DNA genômico de galo foi observada para ambos os primers da ovalbumina e DNA mitocondrial desenhados e validados *in silico* para o DNA de codorna.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente da ovalbumina de codorna através de Nested PCR. (A) Peso molecular com escala de 100 pb. (B-H) amostras seriadas com DNA de codorna e galo (100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001% de DNA de codorna e 100% de DNA de galo respectivamente). (I) Controle negativo com H₂O. A seta indica a posição dos amplicons internos (181 pb).

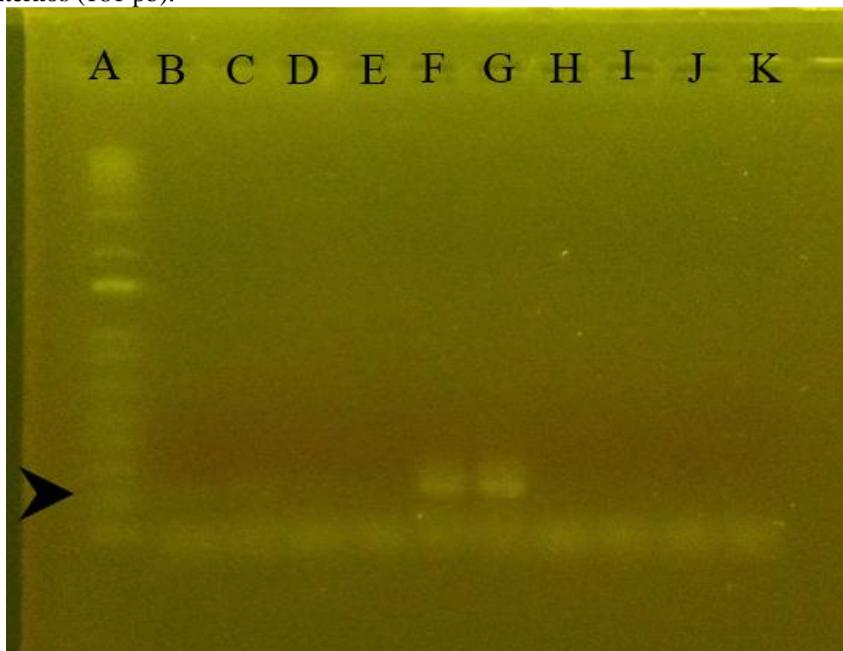


Fonte: Blank (2020)

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente da ovalbumina de codorna (inner modificado) através de Nested PCR. (A) Peso molecular com escala de 100 pb. (B e C) amostras

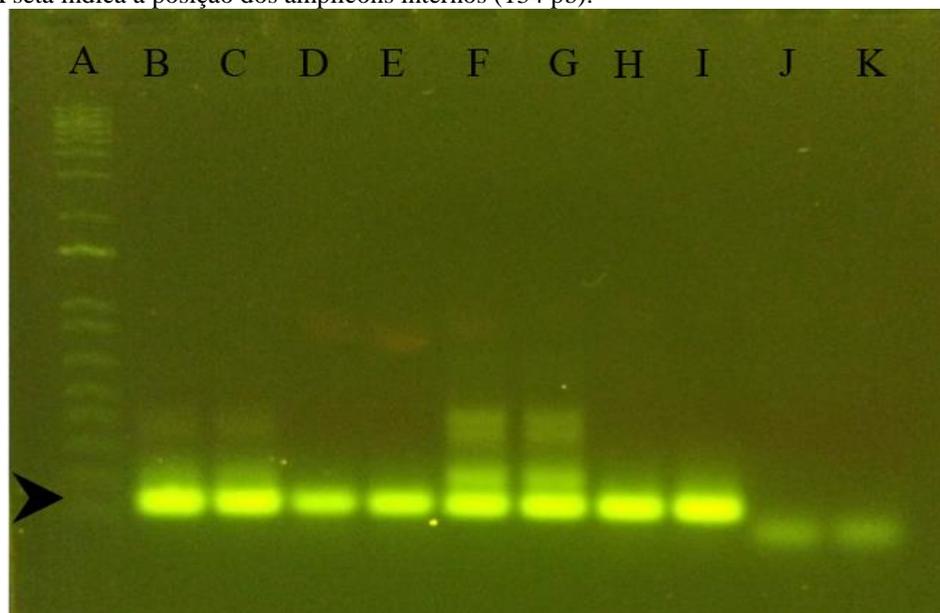
Capítulo 1

de DNA de galo; (D – I) amostras de DNA de codorna; (J e K) Controle negativo com H₂O. A seta indica a posição dos amplicons internos (181 pb).



Fonte: Blank (2020)

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do DNA mitocondrial de codorna através de Nested PCR. (A) Peso molecular com escala de 100 pb. (B - H) amostras seriadas com DNA de codorna (100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001%) e DNA de galo; (I) amostra de DNA de galo; (J e K) Controle negativo com H₂O. A seta indica a posição dos amplicons internos (134 pb).



Fonte: Blank (2020)

3.4. DISCUSSÃO

A maior parte da literatura sobre a produção de quimeras da linha germinativa em aves derivou de pesquisas com PGCs e, portanto, poucos estudos abordaram a preparação de receptores imaturos e adultos visando o transplante de SSC (Trefil et al., 2003; YunBo et al., 2009; Yu et al., 2010; Tagirov e Golovan, 2012). Isso, por sua vez, dificulta a total aplicabilidade da tecnologia SSC em espécies aviárias, uma vez que o uso de protocolos práticos e seguros para a depleção de células germinativas representa um pré-requisito crítico para melhorar a eficiência da colonização de células-tronco transferidas (González e Dobrinski, 2015; Shinohara et al., 2001). Apesar do conhecimento existente, não há informações disponíveis sobre a preparação de aves neonatos como receptores, uma abordagem que em mamíferos provou aumentar a disponibilidade e acessibilidade do nicho espermatogonial (Shinohara et al., 2001; Oatley e Brinster, 2012). Assim, demonstramos que a quimioterapia com doses fracionadas constitui uma estratégia viável para esgotar células germinativas endógenas em pintos recém-nascidos, minimizando os efeitos colaterais gerais e a mortalidade. De fato, todas as perdas registradas no presente estudo ocorreram devido a injeções acidentais no intestino durante a primeira semana de tratamento, o que levou a mortes mesmo no grupo de veículos. Esses achados estão de acordo com trabalhos anteriores com galos da idade puberal, nos quais os indivíduos exibiram melhor tolerância a doses múltiplas de bussulfano do que a aplicações de dose única em termos de taxa de sobrevivência (Tagirov e Golovan, 2012).

Embora fosse esperado um ganho de peso mais lento durante a quimioterapia, os pintos só apresentaram pesos corporais significativamente menores após as 4 semanas de idade e, no geral, nenhuma diferença estatística foi detectada para essa variável. Uma tendência semelhante foi encontrada para o consumo de ração, com valores mais baixos (mas não significativos) nos grupos Bu. Os efeitos do bussulfano no desempenho do crescimento foram descritos anteriormente por Honaramooz et al. (2005), que observaram que leitões de porcas prenhes tratadas com bussulfano eram menores e tinham ganho de peso reduzido durante as primeiras

Capítulo 1

6 semanas, quando comparados aos seus congêneres não tratados. No entanto, galos imaturos apresentaram declínios mais leves no peso corporal quando quantidades iguais de bussulfano foram aplicadas em duas doses em vez de injeções únicas (ou seja, 20 + 20 mg / kg em vez de 40 mg / kg), o que implica que regimes fracionados são fisiologicamente menos estressantes para os receptores (Tagirov e Golovan, 2012). Além disso, nosso protocolo não pareceu perturbar seriamente a eritropoiese, pois diminuições moderadas no hematócrito foram percebidas apenas nos grupos VE e Bu10, resultado considerado promissor em vista das mortes por anemia grave anteriormente documentada em camundongos, porcos e galos após grandes doses de bussulfano (Yu et al., 2010; Bucci e Meistrich, 1987). Efeitos colaterais ligados ao veículo (DMSO) também foram sugeridos em leitões e galos (Tagirov e Golovan, 2012; Honaramooz et al., 2005) e, conseqüentemente, ainda não está claro se a anemia mostrada aqui surgiu como resultado da toxicidade por DMF ou bussulfano. Outro elemento que possivelmente atenuou a influência do bussulfano na saúde geral foi a preparação de filhotes, em vez de galos adultos como receptores. Este conceito foi baseado em dados anteriores, em que as doses máximas pediátricas para 16 agentes quimioterapêuticos (incluindo o bussulfano) excederam as doses máximas em adultos devido ao metabolismo e depuração mais rápida em crianças (Balis, 1997; Russell e Kangarloo, 2008). Portanto, parece razoável supor que mecanismos semelhantes possam existir em pintos recém-nascidos, conferindo-lhes maior tolerância aos protocolos de quimioterapia.

A exposição precoce ao bussulfano também induziu um declínio nos níveis de testosterona, mas, diferentemente da dose mais alta, as injeções nas concentrações de 10 e 20 mg / kg não resultaram em supressão permanente em galos, restaurando a esteroidogênese às 15 e 25 semanas de idade, respectivamente. As reduções na testosterona após o tratamento com bussulfano foram descritas anteriormente em ratos fetais e pré-púberes, mas não em camundongos adultos, variação que parece estar relacionada à idade no tratamento e /ou

Capítulo 1

tolerância específica das espécies de células de Leydig ao bussulfano (Viguiet-Martinez et al., 1984; Boujrad et al., 1995a; Boujrad et al., 1995b; O'Shaughnessy et al., 2008; Zohni et al., 2012; Payerhdar et al., 2017). Além disso, as reduções na produção de testosterona são presumivelmente causadas pelo esgotamento numérico das células de Leydig e afetam direta e indiretamente a espermatogênese (Viguiet-Martinez et al., 1984; Boujrad et al., 1995a; Boujrad et al., 1995b; Smith et al., 2015). Consistente com esse conhecimento, a produção de espermatozoides foi inicialmente prejudicada em galos tratados com 10 e 20 mg / kg, mas depois foi parcialmente recuperada juntamente com a restauração da atividade esteroidogênica (uma média de 55,3% e 15,7% da produção espermática de controle, respectivamente). No entanto, semelhantemente aos níveis de testosterona, a espermatogênese em indivíduos injetados com 40 mg / kg não foi restabelecida ao final do estudo. Assim, acreditamos que a dose mais alta levou a um dano mais persistente à espermatogênese, não apenas por seu impacto direto nas células germinativas, mas também por seu impacto nas células somáticas (particularmente nas células de Leydig). Esses efeitos colaterais podem representar um problema sério em estudos envolvendo transplante de células germinativas, uma vez que o retorno e expansão do SSC dependem muito das células de suporte somáticas (ou seja, células de Sertoli, Leydig e mióides) (Oatley e Brinster, 2012). Isso, junto com dados anteriores que definem 30 mg / kg como uma dose ideal para preparar camundongos receptores (Bucci e Meistrich, 1987; O'Shaughnessy et al., 2008; Zohni et al., 2012; Wang et al., 2010), sugere que doses fracionadas de 20 mg / kg ou um pouco mais altas (por exemplo, 30 mg / kg) podem ser mais adequados para garantir a depleção de células germinativas sem prejudicar as populações somáticas de células de suporte nos testículos de galos.

Diminuições dependentes da dose no IGS, bem como no diâmetro e na pontuação dos túbulos seminíferos também foram observados após nosso protocolo quimioterápico. Essas respostas ao tratamento com bussulfano não foram surpreendentes, uma vez que os testículos e

Capítulo 1

túbulos seminíferos sem espermatogênese são conhecidos por reduzirem em grande parte o tamanho (Trefil et al., 2003; Pereira et al., 2013; Tagirov e Golovan, 2012; Honaramooz et al., 2005; Viguier-Martinez et al., 1984; Boujrad et al., 1995a; Boujrad et al., 1995b; Zohni et al., 2012; Wang et al., 2010; Brinster e Zimmermann, 1994). Não obstante, a dose mais alta foi claramente prejudicial para o epitélio seminífero às 6 semanas de idade, uma vez que a histologia revelou túbulos vazios ou túbulos contendo células mortas na maior parte do parênquima testicular. Simultaneamente, múltiplas injeções de 20 mg / kg pareciam proporcionar o efeito desejado nas células germinativas sem danificar as células somáticas dos testículos, enquanto 10 mg / kg aparentemente não eram suficientes para esgotar as células germinativas. Análises subsequentes às 30 semanas de idade confirmaram o impacto deletério a longo prazo do bussulfano a 40 mg / kg no peso e morfologia dos testículos, dada a virtual ausência de células haplóides nos túbulos seminíferos. Por outro lado, os galos tratados com 10 e 20 mg / kg restabeleceram o epitélio germinativo em diferentes graus, indicando que mais células germinativas foram capazes de sobreviver aos efeitos tóxicos do bussulfano na dose mais baixa. Mais uma vez, esses achados apoiaram a ideia de que doses fracionadas de bussulfano entre 20 e 40 mg / kg talvez sejam o protocolo de quimioterapia mais adequado para a preparação de receptores de pintos.

O NANOG é um fator de transcrição da homeobox necessário para manter a pluripotência nas células-tronco embrionárias de mamíferos (ESCs) e cujo padrão de expressão pós-natal nos testículos de várias espécies implica seu envolvimento na atividade das células-tronco de células germinativas indiferenciadas (Goel et al., 2008; Kuijk et al., 2010; Fujihara et al., 2011; Goel et al., 2011; Ventelä et al., 2012). Em galinhas, o NANOG é expresso em células individuais espalhadas pelo epiblasto nos estágios HH1 e HH3 (supostamente PGCs), e fica restrito às células germinativas durante o desenvolvimento embrionário tardio (Nakanoh et al., 2015; Cañón et al., 2006; Lavial et al., 2007). Portanto, os anticorpos contra a proteína NANOG

Capítulo 1

de galinha (cNANOG) foram escolhidos para examinar a eficiência de doses fracionadas de bussulfano na redução da presença de células germinativas endógenas nos testículos de pintos. Nossos resultados revelaram que o bussulfano a 10 mg / kg reduziu significativamente as células testiculares que expressam cNANOG, enquanto a expressão de cNANOG foi detectada em praticamente nenhuma célula e nenhuma célula nas doses de 20 e 40 mg / kg, respectivamente. Isso, em certa medida, fortalece nossos resultados seminais e histológicos, mostrando que doses fracionadas de bussulfano iguais ou acima de 20 mg / kg empobrecem efetivamente as células germinativas endógenas nos receptores de pintos. No entanto, ao contrário da forte coloração nuclear anteriormente relatada em PGCs de galinha (Nakanoh et al., 2015), a expressão de cNANOG em células germinativas de pintos de 6 semanas de idade foi detectada apenas no citoplasma. Imunolocalização citoplasmática de NANOG foi anteriormente observada em gonócitos e espermatogônias de testículos pós-natais de camundongos, porcos, touros e antílope-negro (*Antilope cervicapra*) (Goel et al., 2008; Goel et al., 2011; Ventelä et al., 2012). De acordo com Goel et al. (2008), esse padrão de expressão pós-natal parece variar conforme a idade progride, e a translocação de NANOG do núcleo para o citoplasma pode estar relacionada à sua eventual degradação.

Além disso, examinamos a expressão de marcadores de pluripotência, PGC e SSC por RT-PCR, com o objetivo de ratificar nossos resultados de imunocoloração em relação à depleção de células germinativas. Apesar da ausência de expressão diferencial para *ch-GFR α 1*, os pintinhos submetidos a doses de 20 e 40 mg / kg apresentaram menores expressões de *ch-Nanog* e *ch-c-Myc*, sugerindo um declínio na população de células germinativas endógenas. *Nanog* e *c-Myc* são freqüentemente usados como marcadores de células-tronco, mas suas expressões também foram associadas a PGCs, gonócitos e espermatogônias em proliferação, e parecem diminuir progressivamente à medida que a diferenciação prossegue (Goel et al., 2008; Kuijk et al., 2010; Ventelä et al., 2012; Cañón et al., 2006; Suzuki et al., 1996; Yamaguchi et

Capítulo 1

al., 2005; Hirabayashi et al., 2009; Park et al., 2014; Sisakhtnezhad et al., 2015; Kuijk et al., 2010). No entanto, o fato de a expressão de *ch-GFR α 1* não ter diminuído após a quimioterapia é intrigante e difere dos achados anteriores em macacos rhesus, onde a expressão desse marcador estava ausente após o tratamento com bussulfano (Hermann et al., 2007). É possível que os padrões de expressão de *ch-GFR1* variem de uma maneira dependente da idade, levando a leituras imprecisas sobre a eficiência desses esquemas na destruição das células germinativas. Esse fenômeno foi relatado anteriormente em camundongos, com a expressão de *GFR α 1* ocorrendo em SSCs de filhote, mas não em SSCs neonatais (Ebata et al., 2005), e poderia explicar por que os primers de *ch-GFR α 1* projetados com sucesso para galo adulto (Mucksová et al., 2013) não conseguiram detectar diferenças entre pintos controle e tratados. Além disso, não excluimos a possibilidade de que o *ch-GFR α 1* tenha sido expresso apenas por uma subpopulação de espermatogonias (possivelmente SSCs) que não foi afetada pelo bussulfano. Essa suposição é parcialmente sustentada por estudos anteriores com camundongos neonatais e adultos que mostraram a existência de subconjuntos de espermatogonias indiferenciadas positivas e negativas para *GFR α 1* (Hofmann et al., 2005; Gassei e Orwig, 2013; Niedenberger et al., 2015).

Tendo em vista que o bussulfano induz um bloqueio do ciclo celular G2 e apoptose em células em rápida proliferação (Iwamoto et al., 2004); também ficamos interessados em investigar marcadores pró e anti-apoptóticos nos testículos após regimes de doses fracionadas. Em resumo, a expressão de *ch-Bid* não mudou, independentemente dos aumentos dependentes da dose na expressão de *ch-Bcl-2*. Esses resultados sugerem que a morte celular espermatogênica induzida por Bu possivelmente atingiu seu platô no final do tratamento, deixando apenas uma pequena subpopulação de células que foi resistente aos efeitos citotóxicos desse agente alquilante. Parece provável que essas células resistentes a Bu seja de fato SSCs responsáveis pela expressão de *ch-GFR α 1* detectada nos grupos tratados, uma vez que ambas

Capítulo 1

as características (expressão de *GRFa1* e resistência à quimioterapia) foram anteriormente atribuídas a SSCs (Ebata et al., 2005; Choi et al., 2004; Bugeaw et al., 2005; Naughton et al., 2006). Além disso, acreditamos que a crescente expressão de *Bcl-2* observada em pintos tratados possa estar relacionada a algum mecanismo de proteção dos CSCs contra a quimioterapia. A sobrevivência de SSCs após o tratamento com bussulfano foi previamente descrita em camundongos e aparentemente envolve a modulação do ciclo celular através da inibição da proliferação espermatogonial (ou seja, parada do ciclo celular em G0 / G1 (Choi et al., 2004)). A regulação positiva de *Bcl-2* e outros genes anti-apoptóticos (*Bcl-xl*, *Bcl-2L10*, *Bag3* e *Iap2 / Birc3*) também foram documentados em linhas celulares de leucemia resistente a Bu, capazes de evitar a parada G2 mediada por bussulfano e apoptose (Valdez et al., 2008). No entanto, o aumento acentuado na expressão de *Bcl-2* registrada na dose mais alta (Bu40) combinada com nossas observações de degeneração tubular generalizada indicam que esse protocolo pode não ser ideal para preparar receptores devido ao seu impacto nas células somáticas e, conseqüentemente, no nicho de SSC.

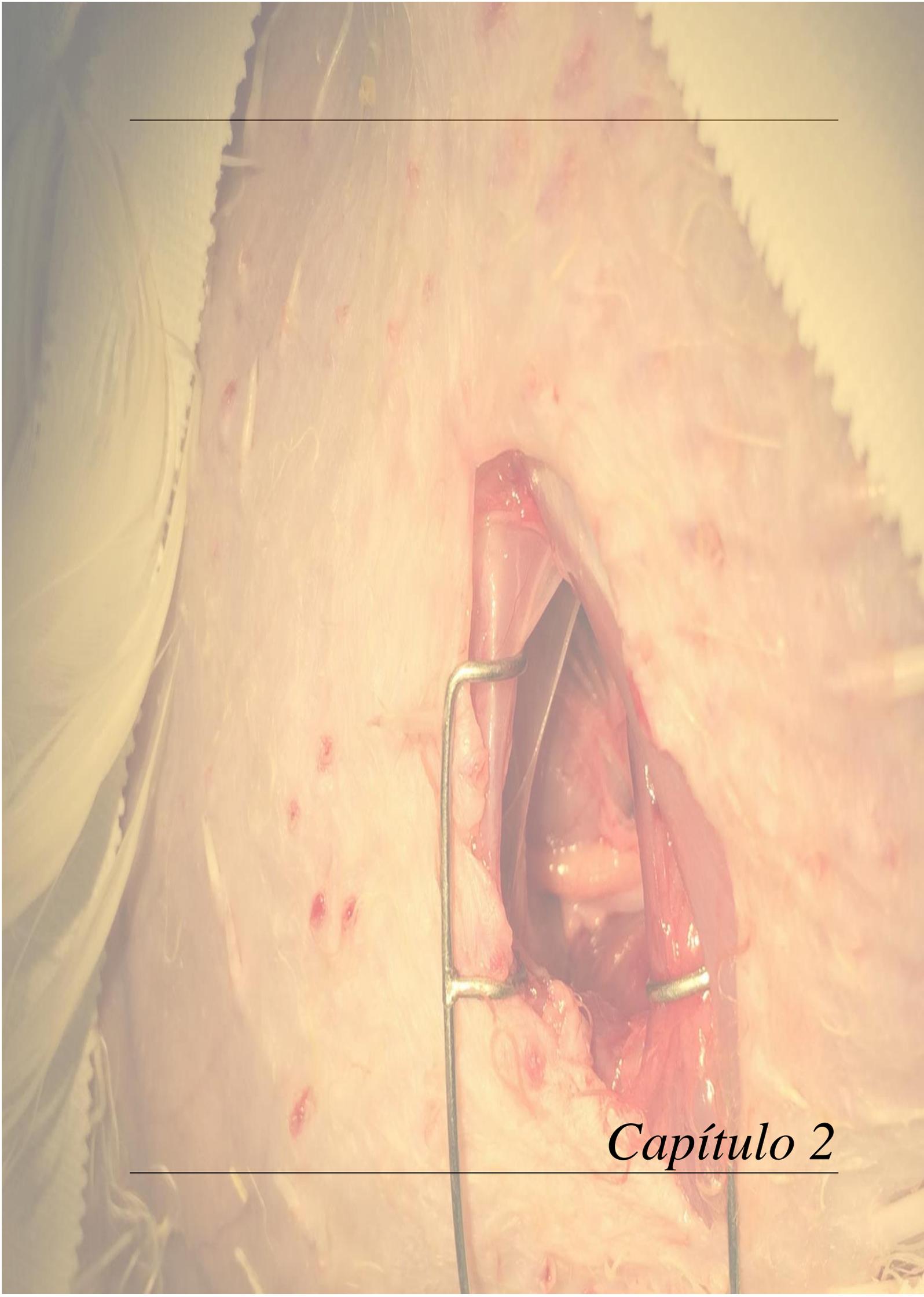
Neste estudo também foi possível comprovar que galos tratados com doses fracionadas de bussulfano (20 mg/kg por semanas) apresentaram imunomarcção testicular para células de codorna após 6 meses do transplante. A observação de células espermatogoniais de codornizes foi previamente descrita por Pereira et al. (2013) em testículos de galos receptores parcialmente esterilizados por radiação gama. Porém, assim como Pereira et al. (2013), neste estudo não foi possível comprovar se as células transplantadas completaram a espermatogênese. Apesar da incapacidade do anticorpo QCPN em marcar espermatozoides de codorna ter contribuído para a não confirmação da espermatogênese completa, uma vez que mesmo em testículos de codorna os espermatozoides não eram marcados, acreditamos que a distância filogenética entre a espécie doadora e receptora possa ser o fator preponderante para ausência dos estágios espermatogênicos finais no nicho testicular receptor (Dobrinski, 2008). Resultados semelhantes

Capítulo 1

em transplantes interespecíficos envolvendo mamíferos e peixes, em que as espécies doadoras e receptoras eram filogeneticamente distantes, foram relatados anteriormente (Dobrinski et al., 1999; Dobrinski et al., 2000; Nagano et al., 2001; Nagano et al., 2002; Silva et al., 2016). Nesses casos, as espermatogônias conseguem colonizar os túbulos seminíferos e se proliferar, mas aparentemente o nicho testicular receptor é incapaz de sustentar a diferenciação espermatogênica e a meiose da espécie doadora.

Adicionalmente, problemas relativos aos pares de primers anteriormente descritos para detecção DNA genômico de codorna (Pereira et al., 2013; Roe et al., 2013) impossibilitaram a confirmação dos resultados de imunohistoquímica, além inviabilizar a determinação da presença ou não de espermatozoides de codorna no sêmen dos receptores. As dificuldades encontradas referem-se principalmente ao aparecimento de falsos-positivos em amostras provenientes de galos controle (ou seja, receptores que não sofreram transplantes). Neste sentido, esforços futuros serão realizados na tentativa de padronizar pares de primers mais específicos que nos permitam não só confirmar a presença de células de cordona nos testículos, como também no sêmen.

Em conclusão, mostramos que a quimioterapia com doses fracionadas usando injeções repetidas de bussulfano (na dose de 20 mg / kg) é um método simples, barato e seguro para suprimir a espermatogênese endógena em pintos recém-nascidos e, pode ser empregado com sucesso no transplante de SSC em espécies de aves. Além disso, nossos resultados sugerem que, após esse regime de quimioterapia, algumas células germinativas de codornas foram capazes de colonizar os túbulos seminíferos receptores após o transplante, mas não de reestabelecer a espermatogênese completa.



Capítulo 2

4. CAPÍTULO 2 – CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CRACÍDEOS AMEAÇADOS POR MEIO DE TRANSPLANTES INTERESPECÍFICOS DE CÉLULAS GERMINATIVAS.

4.1. INTRODUÇÃO

A perda da biodiversidade global decorrente de ações antrópicas tem elevado nas últimas décadas o número de aves listadas como ameaçadas de extinção. Nesta infeliz lista, destaca-se na região neotropical os cracídeos cujo número de espécies categorizadas como ameaçadas atinge 39,3% do táxon (IUCN, 2019). Paralelamente, o Brasil amarga o fato de ter em sua história recente a extinção na natureza de uma emblemática espécie pertencente a este grupo, o mutum-de-Alagoas (*Pauxi mitu*). Frente a atual conjuntura, ações coletivas entre instituições mantenedoras, centros de pesquisa e Ministério do Meio Ambiente (MMA) levaram à implementação do Plano de Ação Nacional (PAN) para a conservação dos Galliformes e do mutum-de-Alagoas (*Pauxi mitu*) e, por conseguinte, definiram que entre as ações imediatas e de alta prioridade referentes ao manejo das populações está o desenvolvimento de metodologias para reprodução assistida da espécie (Silveira et al., 2008a; 2008b).

Todavia, técnicas comumente empregadas na reprodução assistida de espécies mamíferas ainda não são aplicáveis rotineiramente em aves silvestres devido à dificuldade em obter amostras seminais de boa qualidade e, ao grande tamanho e quantidade de lipídeos depositados no ovo que, por conseguinte, inviabiliza a criopreservação e a regeneração de uma espécie a partir de material celular congelado (Woodcock et al., 2019). Dessa forma, tais desafios levaram nosso grupo de pesquisa a considerar o emprego de transplantes interespecíficos de células germinativas utilizando

Capítulo 2

espermatogônias de cracídeos transplantadas em galos domésticos como uma saída para preservação de germoplasma de machos geneticamente importantes, porém reprodutivamente inaptos. Em aves, os primeiros relatos nesse tema descrevem transplantes intraespecíficos de células germinativas primordiais e células testiculares em galos domésticos, onde ficou comprovada a possibilidade de animais receptores produzirem descendentes viáveis de outras raças (Trefil et al., 2006; Nakamura et al., 2010; Nakamura et al., 2011). Logo após, diversos pesquisadores confirmaram que xenotransplantes de células do blastoderma (CBs) ou de células germinativas primordiais (CGPs) em embriões de galinha resultavam em reprodutores capazes de produzir progênie de outras espécies, tais como codornas, patos, faisões e abertadas (Ono et al., 1996; Li et al., 2002; Soh et al., 2004; Kang et al., 2009; Werney et al., 2010). No entanto, até o momento, certas particularidades das CBs e CGPs (p.e. eficiência reduzida, desperdício de ovos férteis, etc.) limitam o aproveitamento destas células na conservação de espécies criticamente ameaçadas.

Por essa razão, Pereira et al. 2013 recentemente investigaram a viabilidade de células espermatogoniais provenientes de machos adultos em transplantes interespecíficos entre codornas e galos. Apesar de não terem sido realizados testes de progênie, estes estudos demonstraram que semanas após os transplantes essas células não apenas colonizavam os túbulos seminíferos dos receptores, como também possuíam a habilidade de produzir espermatozoides. Tais achados ampliaram as opções de células de espécies de interesse que podem ser resgatadas para futuros xenotransplantes germinativos, além de abrirem a perspectiva de resgate de células germinativas em indivíduos *post-mortem* (p.e. coleta de testículos de embriões machos, machos adultos) ou *in vivo* (p.e. aspirações de células testiculares via endoscópica). Deste modo, em continuidade as pesquisas já realizadas na área, este projeto propõe investigar a

Capítulo 2

capacidade das espermatogonias de cracídeos em colonizar os túbulos seminíferos de galos receptores e se, em alguns casos, o transplante germinativo resultará na produção de espermatozóides. Os dados gerados por esse estudo serão relevantes para a manutenção da biodiversidade genética de cracídeos ameaçados, em especial do mutum-de-Alagoas, pois servirão de base para o desenvolvimento de uma metodologia inovadora para conservação e disseminação de material genético de machos de várias idades (de embriões a indivíduos senis), vivos ou recém-falecidos.

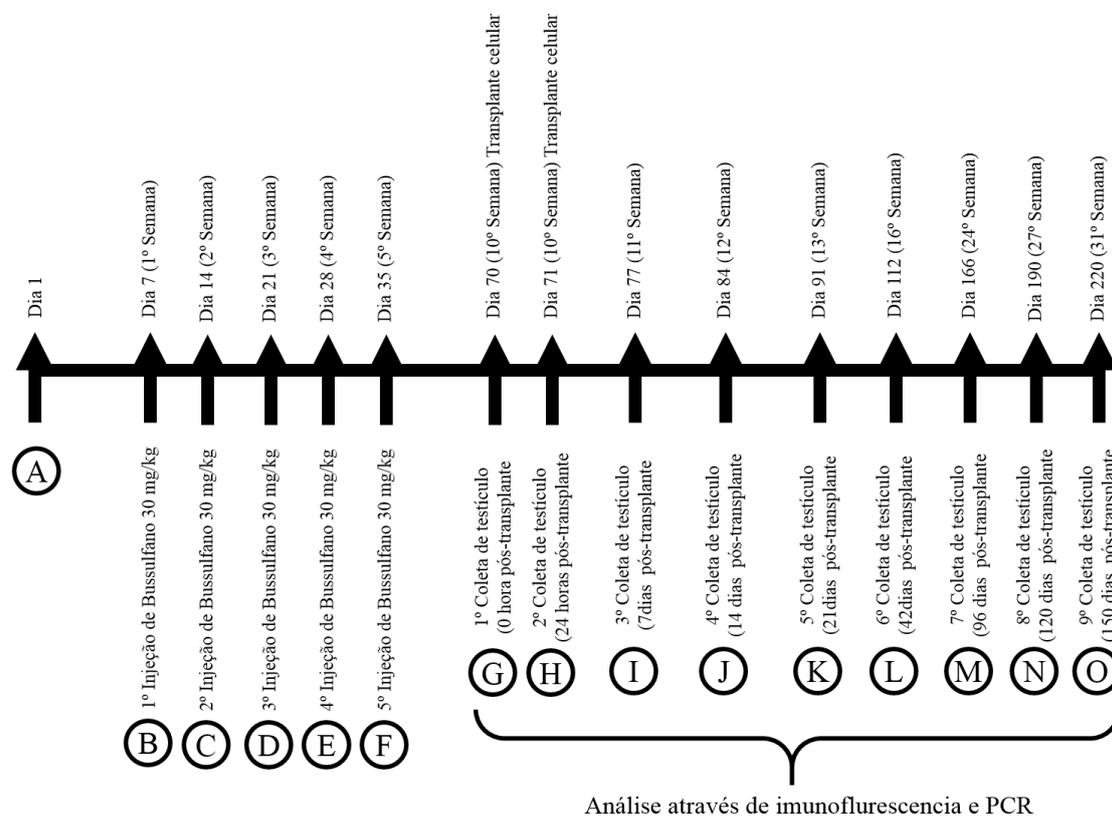
4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. *Delineamento experimental*

Após o óbito ou eutanásia, testículo de cracídeos de diferentes idades e espécies foram coletados, lavados (PBS 3x) e encaminhados (refrigerados a 4° C) imediatamente para nosso laboratório, para isolamento e congelamento das células germinativas. Após o descongelamento, essas células foram marcadas (PKH26 cell tracker, Sigma) e transplantadas em galos domésticos de 9 semanas de idades (n = 32) parcialmente esterilizados com doses fracionadas de bussulfano. Para verificar a presença de células de mutuns positivamente marcadas com PKH26, receptores (n = 4) foram eutanasiados em diferentes tempos (0 e 24 horas e 7, 14, 21, 42, 96 e 120 dias) após o transplante e, seus testículos foram coletados, crio-seccionados, contra-corados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma) e avaliados por imunofluorescência. Por fim, todos os testículos monitorados (positivos ou não para células de cracídeos) foram avaliados quanto a presença de células de mutuns pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O desenho experimental utilizado neste estudo é demonstrado na figura 9.

Capítulo 2

Figura 14 - Cronograma do projeto experimental. Para realizar a depleção das células germinativas endógenas dos receptores, pintinhos (n = 32) de um dia de vida foram alojados no biotério experimental de aves (A) antes de serem submetidos a injeções repetidas intraperitonealmente de 30 mg/kg de bussulfano por 5 semanas (B-F). Cinco semanas após o término do tratamento quimioterápico, as aves receptoras receberam células germinativas de cracídeos marcadas com PKH26 através de injeções intra-testiculares (G-H). Para avaliar o desenvolvimento (proliferação e diferenciação) das células germinativas transplantadas, os testículos foram coletados em períodos de tempo específicos (G-O; de 0 hora a 150 dias) e processados para análise de imunofluorescência e genética (PCR).



Fonte: (Blank) 2020

4.2.2. Animais

Trinta e dois pintinhos da raça Hissex White (*Gallus gallus domesticus*) foram utilizados como receptores das células germinativas oriundas de mutuns. De 1 até 30 dias de idade, todos os pintinhos foram mantidos em gaiolas coletivas (25 x 50 x 20 cm) localizadas no Biotério Experimental de Aves do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP). Posteriormente, esses animais foram mantidos em gaiolas individuais (30 x 45 x 45 cm) situadas no mesmo biotério. Todos os animais utilizados neste estudo foram mantidos segundo as normas de manejo e criação rotineiramente praticadas pela

Capítulo 2

avicultura industrial com água *ad libitum* e programa de restrição alimentar. Todos os protocolos descritos neste estudo foram analisados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ – USP.

4.2.3. *Preparo dos receptores*

A depleção das células germinativas dos pintinhos receptores foi realizada através da aplicação de doses fracionadas de bussulfano como previamente descrito no capítulo 1. Semanalmente o peso médio dos pintinhos foi utilizado para calcular a concentração das soluções de bussulfano a serem injetadas. Para o preparo das soluções, o bussulfano (Sigma, B2635) foi inicialmente dissolvido em dimetilformamida (DMF – Sigma, D4551) (vortex por 10 minutos), e imediatamente antes das injeções um volume igual de água destilada (37° C) foi adicionado alcançando uma concentração de 30 mg/ kg. Essas soluções foram administradas intraperitonealmente, a partir da primeira semana de vida dos pintinhos, por cinco semanas consecutivas, utilizando seringas agulhadas de tuberculina (Luer slip 1 mL, 0.38 x 13 mm, BD Plastipak).

4.2.4. *Obtenção das gônadas de cracídeos*

Após o óbito ou eutanásia, testículos foram coletados, lavados e armazenados para o transporte até o nosso laboratório seguindo o protocolo descrito por Jahnukainen et al. (2007). Resumidamente, após a coleta os testículos foram lavados 3 vezes utilizando 10 mL de PBS estéril contendo 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Gibco), acondicionados em tubos cônicos do tipo falcon contendo meio Waymouth (Invitrogen, 15 mL), e enviada via SEDEX10[®] para o nosso laboratório em caixa térmica de isopor a 4°C.

4.2.5. *Dispersão e congelamento das células testiculares*

Ao chegar em no laboratório, os testículos enviados pela instituição mantenedora foram imediatamente lavados 3 vezes utilizando 10 mL de PBS estéril contendo 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Gibco), dissociados e congelados seguindo protocolo descrito por Guan et al. (2009). Inicialmente, os testículos foram finamente cortados em fragmentos de 1 – 2 mm² e incubados (37° C, 5% CO₂, UR 90%) com 1 mg/mL de colagenase IV (Sigma) em 4 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) por 20 min e dispersos por pipetagem. A suspensão resultante foi então centrifugada (200g, 5 min) para retirada do meio, lavada 3 vezes em PBS (10 mL), e incubada em 4 mL de solução de tripsina/EDTA (0,05% e 0,5 mM, respectivamente) por 5 min (37°C, 5% CO₂, UR 90%). Em seguida, a tripsina foi inativada com 20% de soro fetal bovino (Gibco) e, a suspensão foi filtrada (cell strainer 70 µm, BD Biosciences), centrifugada (500g; 5 min), e reconstituída vagarosamente em de meio DMEM contendo 20% de soro fetal bovino e 8% de DMSO e 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Gibco) a uma concentração final de 5 x 10⁶ células/ mL. Previamente ao congelamento, uma alíquota de 5 µL foi diluída em 45 µL de solução contendo azul de tripan (0,4%)/PBS (25 µL de azul de tripan e 20 µL de PBS) para avaliação da viabilidade celular. Finalmente, a suspensão foi transferida para criotubos e, em seguida, colocados em um container de congelamento (Mr. Frosty, Thermo Fischer Scientific) e mantidos em freezer -80° C overnight. No dia seguinte, os criotubos foram transferidos para um botijão de nitrogênio líquido (-196° C) para estocagem a longo prazo.

4.2.6. *Descongelamento e marcação das células doadoras*

Capítulo 2

Antes dos transplantes, a suspensão de células testiculares foi descongelada a 37°C por 2 min e as espermatogonias foram incubadas com o corante fluorescente de membrana PKH26 (Sigma). A coloração das células foi realizada seguindo as instruções do fabricante (Anexo F) com uma concentração final de 9 µM do corante PKH26. As células coradas foram então suspensas em meio DMEM a uma concentração de 20×10^6 células/ mL. Em seguida, uma alíquota de 5 µL foi diluída em 45 µL de solução contendo azul de tripan (0,4%)/PBS (25 µL de azul de tripan e 20 µL de PBS) para avaliação da viabilidade celular. Concluída essa etapa, as espermatogonias foram mantidas refrigeradas 5° C até o momento do transplante.

4.2.7. *Transplante celular*

Para a realização dos transplantes, todos os animais foram submetidos a anestesia geral inalatória (isoflurano). O acesso aos testículos foi efetuado por meio de uma pequena incisão (1-2 cm) na região lateral logo após a última costela. Após a visualização dos testículos, os machos receptores (frangos de 9 semanas) receberam através de uma micro-seringa analítica de cromatografia (Hamilton®) 50 µL da suspensão de espermatogonias (aproximadamente $0,2 \times 10^6$ células por testículo) provenientes de machos das espécies Mutum-de-penacho (*Crax fasciolata*) e Mutum-poranga (*Crax alector*). A sutura da pele foi feita com fio monoylon (4.0 a 6.0) e o tratamento pós-cirúrgico foi realizado com anti-inflamatório/analgésico/antibiótico (0,3 mg/ kg meloxicam, 0,1 mg/ kg tramadol, 0,5 mg/ kg dipirona, 5 mg/ kg enrofloxacin, respectivamente) por 5 dias após o transplante.

4.2.8. *Avaliação microscópica das células transplantadas*

Capítulo 2

Com o intuito de monitorar não só o paradeiro como também o estágio de desenvolvimento das células germinativas transplantadas de mutum, testículos de aves receptoras foram coletados às 0 e 24 horas e 7, 14, 21, 42, 96 e 120 dias após o transplante. Após a coleta, os testículos foram lavados 3 vezes com PBS, incorporados no meio de congelamento Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura), congelados em nitrogênio líquido e, armazenados em *freezer* a -80° C. Os moldes contendo fragmentos testiculares foram posteriormente crioseccionados (10 µm) e as criosecções foram contra-coradas com DAPI 1:1000 por 5 min e, subsequentemente, analisadas sob microscopia de fluorescência.

4.2.9. Avaliação genética

O DNA genômico proveniente do tecido testicular de 32 testículos foi extraído através do kit DNeasy® Blood & Tissue (Quiagen, Netherlands) de acordo com as instruções do fabricante (Anexo E). A concentração de DNA (ng / µl) foi determinada com o espectrofotômetro ND-1000 a 260 nm (NanoDrop®, Thermo Scientific). Apenas DNAs puros (razão de 260/280 nm em torno de 2,0) foram empregados para as reações de PCR. Para detecção do DNA de *Crax fasciolata* e *C. alector* consistiu na utilização de dois pares (externo e interno): 5' – primer externo, 5' - CTTCTCCTCCGTGGCTCATAAC-3'; 3' – primer externo, 5'-GGTTAGGATGGAAGAAGGCGAG-3'; 5' – primer interno, 5'-GCTTCTACTACGGCTCATAACCT-3'; 3'-primer interno, 5'-CATTCTACCAGGGTTTGTCCGA-3' que amplificam a sequência do DNA do Citocromo B para ambas as espécies (GenBank código: AY659790 - *C. fasciolata*; AY659789.1 - *C. alector*); a especificidade e sensibilidade dos primers foi testada *in silico* e *in vitro*. O teste *in silico* consistiu na utilização da ferramenta de especificidade

Capítulo 2

Primer-BLAST contra a base de dados de *Gallus gallus* do GenBank e nenhuma evidência de amplificação cruzada foi observada. Seguidamente, o teste *in vitro* incluiu diluições seriadas de DNA genômica de *C. fasciolata* e *C. alector* e de *G. gallus* (de 0 ng/μL até 100 ng/μL) e, nenhuma evidência de amplificação inespecífica foi detectada. Para a preparação da reação de PCR, 1 μl de DNA (100 ng/μl) foi adicionado a uma mistura (24 μL) consistindo de 12,5 μL de Taq Pol Master mix (Cellco, Brasil), 0,75 μl de cada primer (0,3 μM) e 10 μL de água ultrapura (UltraPure DNase/RNase free distilled Water, Invitrogen). Em seguida, a reação de PCR foi adicionada em um termociclador (Mastercycler Eppendorf®). O ciclo de reação par de primers externos que consistiu de uma etapa de desnaturação 95° C por 10 min, seguido por 20 ciclos de desnaturação (95° C, 30 seg), anelamento (60° C, 30 seg) e extensão (72° C, 30 seg) e, extensão final em 72° C por 10 min. Então, 2 μl do produto da primeira amplificação foi utilizado como molde para uma segunda reação (12,5 μL de Taq Poli Mix, 0,75 μL de cada primer e 9 μL de água ultra pura) utilizando os *primers* internos, que diferiram do primeiro por adicionar 10 ciclos adicionais (total de 30 ciclos). Os produtos de PCR (tamanho previsto de 184 pb) foram separados por eletroforese em gel de agarose de 1,5% (110 V por 50 min). Para toda reação foram utilizados controles positivos contendo DNA de *C. alector* e *C. fasciolata* e, controle negativo contendo DNA de *G. gallus* e água ultrapura.

4.2.10. Análise estatística

Neste estudo comparações entre grupos foram feitas apenas para as variáveis viabilidade celular e total de células recuperadas, a determinação do número de galos receptores com células germinativas doadoras em seus testículos foi realizada de forma descritiva e, por conseguinte, não foi necessário à aplicação de testes estatísticos. Para os dados estatisticamente testados, os valores são apresentados como média ± erro-padrão.

Capítulo 2

Inicialmente, as variáveis foram testadas para determinar a homogeneidade das variâncias e normalidade dos dados, não havendo necessidade de transformações. Em seguida, o teste t student foi aplicado para comparar as médias entre dois grupos respeitando um nível de significância de $P < 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS System para Windows 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

4.3. RESULTADOS

Ao todo de dezembro de 2017 a novembro de 2018 foi possível coletar testículos de 14 cracídeos, sendo em grande maioria indivíduos adultos (85,7%) (Tabela 4). No geral, a espécie com o maior número de testículos coletados foi o mutum-de-penacho (*Crax fasciolata*), com 7 das 14 coletas, seguido pelo mutum-de-Alagoas (*Pauxi mitu*) com duas coletas. Para as demais espécies, mutum-poranga (*Crax alector*), mutum-de-bico-vermelho (*Crax blumenbachii*), mutum-de-bico-amarelo (*Crax daubentoni*), mutum-grande (*Crax rubra*) e Jacucaca (*Penelope jacucaca*) apenas um indivíduo foi coletado. Em 57,14% dos casos a eutanásia foi recomendada devido a problemas locomotores (ou seja, problema articular severo, claudicação severa e, perna amputada), subnutrição derivada de problemas no bico e, catarata severa, enquanto os demais casos de óbito derivaram de patologias encontradas *post mortem* (ou seja, peritonite e osteossarcoma) e, casos acidentais (e.g., predação, pescoço enroscado na tela e, morte na anestesia).

Capítulo 2

Tabela 6 – Sumário de coleta de material e da dissociação de tecido testicular para a obtenção de células doadoras no período de 12/2017 a 11/2018.

Espécie	Data	Instituição ¹	Idade	Peso ave	Peso testicular	IGS ²	Céls. /mL	Total cels. recuperadas	Viabilidade (%)
Mutum-poranga (<i>Crax alector</i>)	09/02/18	ZA	Adulto	2.858 g	2,56 g	0,090	94 x 10 ⁶	188 x 10 ⁶	84,0
Mutum-de-bico-vermelhos (<i>Crax blumenbachii</i>)	14/06/18	CCB	Adulto	—	0,06 g	—	5 x 10 ⁶	10 x 10 ⁶	66,6
Mutum-de-bico-amarelo (<i>Crax daubentoni</i>)	21/02/18	ZA	Adulto	—	0,03 g	—	5 x 10 ⁶	10 x 10 ⁶	66,6
Mutum-de-penacho (<i>Crax fasciolata</i>)	14/12/17	IPM	Adulto	—	1,03 g	—	11 x 10 ⁶	22 x 10 ⁶	50,0
	12/05/18	ZA	Adulto	2.405 g	0,19 g	0,008	5 x 10 ⁶	15 x 10 ⁶	80,0
	15/06/18	CCB	Adulto	2.000 g	0,27 g	0,010	15 x 10 ⁶	30 x 10 ⁶	75,0
	16/06/18	CCB	Adulto	—	1,77 g	—	30 x 10 ⁶	60 x 10 ⁶	75,0
	17/08/18	CCB	Adulto	—	2,85 g	—	38 x 10 ⁶	76 x 10 ⁶	60,0
	17/08/18	CCB	Jovem	1.200 g	0,04 g	0,003	2 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶	50,0
	17/08/18	CCB	Jovem	—	0,56 g	—	11 x 10 ⁶	22 x 10 ⁶	50,0
Mutum-grande (<i>Crax rubra</i>)	18/06/18	ZA	Adulto	3.432 g	0,32 g	0,009	3 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	75,0
Mutum-de-Alagoas (<i>Pauxi mitu</i>)	04/05/18	ZA	Adulto	1.750 g	0,42 g	0,020	3 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	66,6
	18/06/18	ZA	Adulto	2.064 g	0,43 g	0,020	4 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶	60,0
Jacucaca (<i>Penelope jacucaca</i>)	09/02/18	ZA	Adulto	943 g	0,29 g	0,030	22 x 10 ⁶	44 x 10 ⁶	66,6

¹ZA – Zoo das Aves (Poços de Caldas – MG), CCB – Criadouro Crax Brasil (Contagem – MG), IPM – Instituto Pauxi mitu;

²Índice Gonadossomático (peso testículos / peso corpóreo x 100);

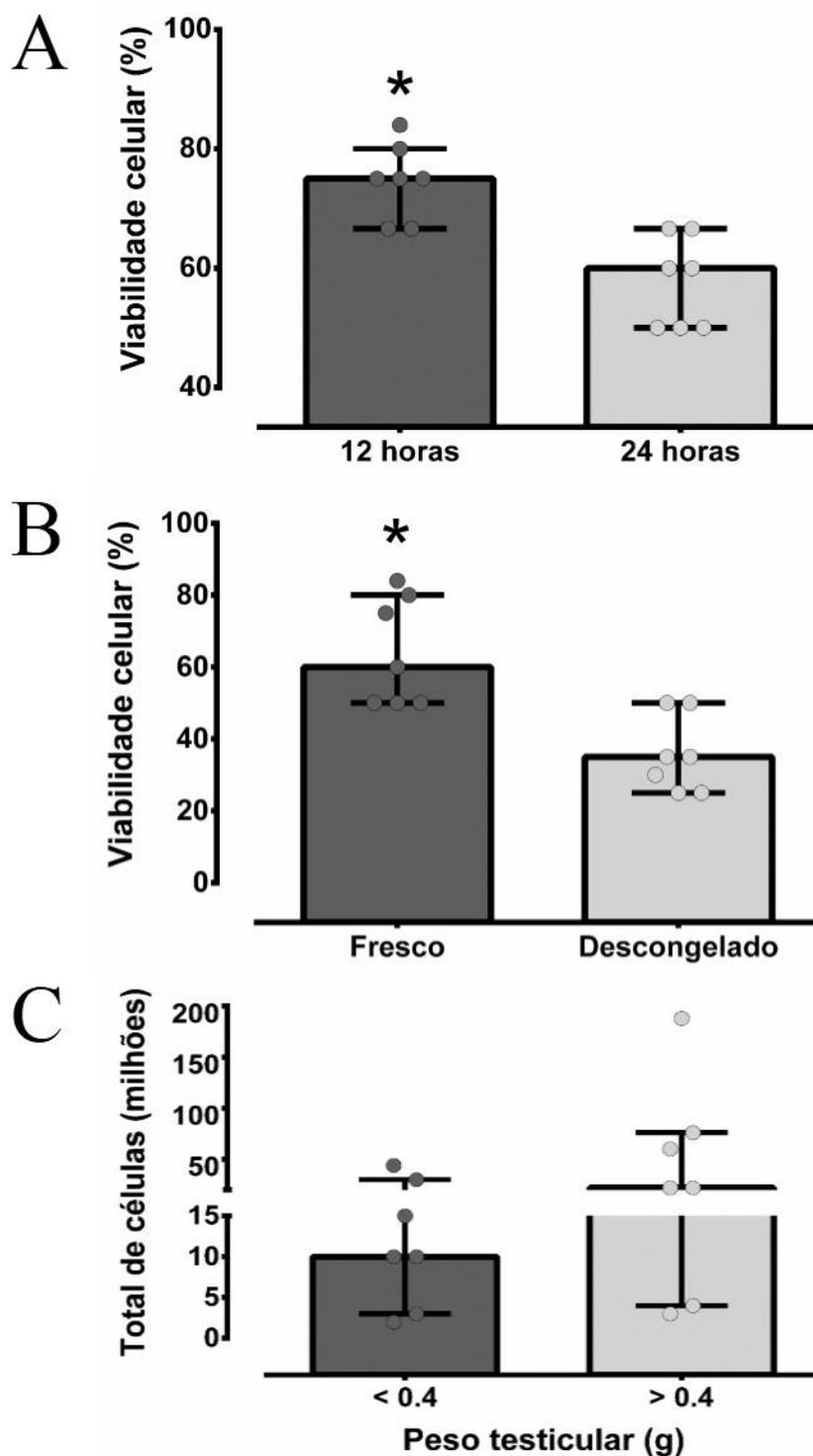
Fonte: Blank (2020).

Capítulo 2

Considerando os desafios logísticos relativos desde o registro do óbito até o processamento das amostras, os intervalos variaram entre 12 e 24 horas, e apesar desse fator ter afetado significativamente ($p < 0.05$) a viabilidade celular (Figura 10A), observamos que de modo geral esse parâmetro se manteve em um patamar considerado aceitável pois 11 das 14 suspensões apresentaram viabilidade superior à 60%. Contudo, considerando apenas as partidas que foram utilizadas no momento dos transplantes (i.e., todas as amostras de *C. alector* e *C. fasciolata*) a viabilidade celular após o descongelamento caiu significativamente ($64,14 \pm 5,73$ fresco e $35,71 \pm 3,98$ descongelado; $p < 0.05$ - Figura 10B). Por outro lado, a ausência de espermatogênese na maioria dos testículos processados refletiu em gônadas extremamente pequenas ($< 1,0$ g) e com baixa eficiência de recuperação celular ($2 - 44 \times 10^6$ células testiculares por aves) independentemente do seu peso (Figura 10C). Todavia, a ausência de espermatogênese contribuiu em uma maior proporção de espermatogonias na fração celular recuperada.

Capítulo 2

Figura 15 – (A) Taxa de viabilidade celular em relação ao tempo total desde a morte da aves até o processamento do material no laboratório. (B) Taxa de viabilidade celular das amostras utilizadas no transplante antes e após a criopreservação. (C) Total de células recuperadas por peso testicular. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos $p < 0.05$.



Fonte: Blank (2020)

Com relação a preparação dos pintos receptores, todas as mortes registradas (12 de 100 aves) ocorreram principalmente durante as duas primeiras semanas de tratamento

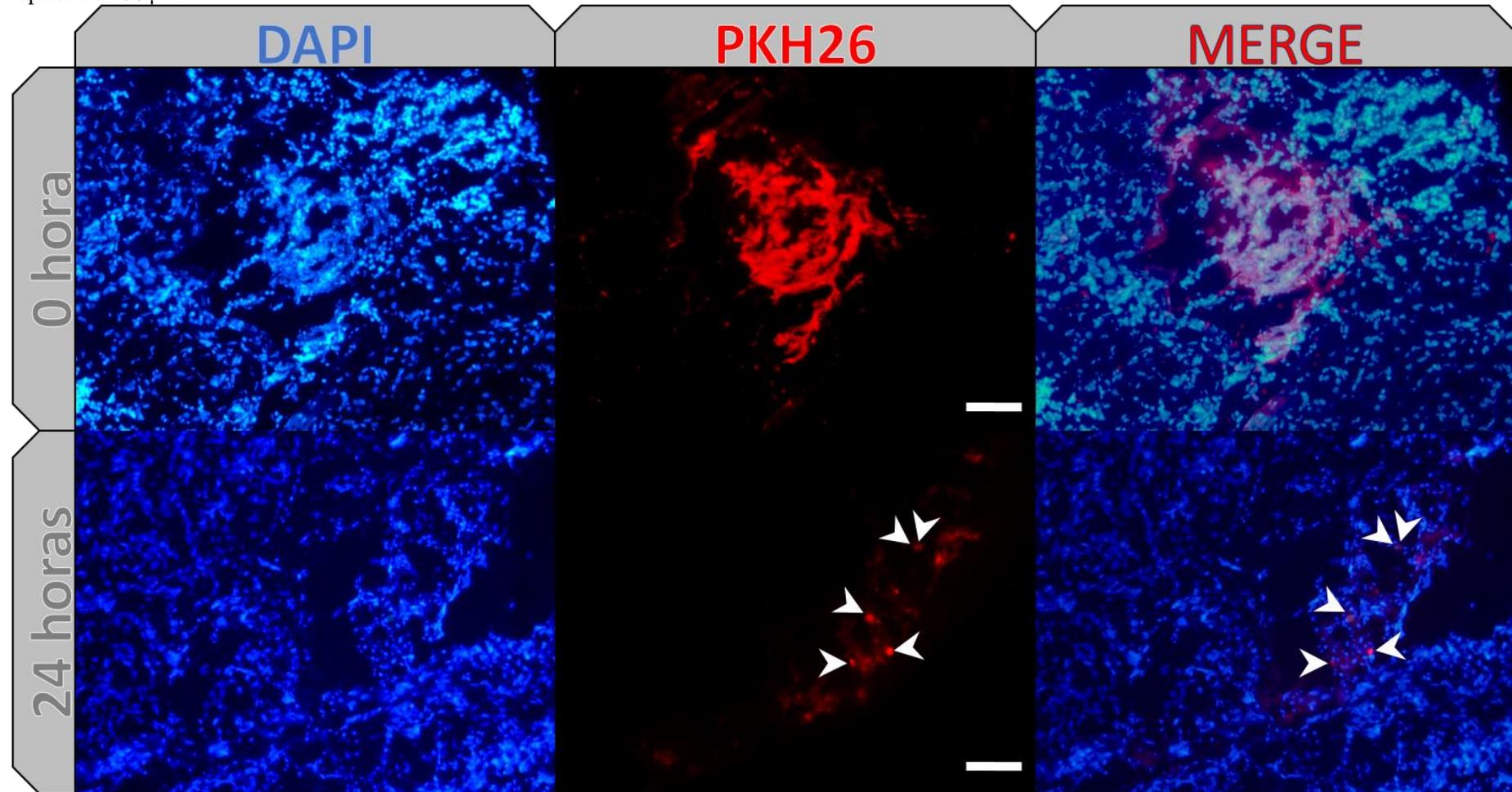
Capítulo 2

83,33%, possivelmente devido a injeções incorretas no intestino que resultaram em necrose intestinal (confirmada na necropsia), as demais mortes ocorreram na quarta semana em aves de menor peso, provavelmente por apresentarem maior susceptibilidade ao tratamento quimioterápico. No geral, a taxa de mortalidade acumulada ao longo das cinco semanas de tratamento foi de 12%, enquanto a taxa semanal de ganho de peso foi de 24, 32, 35 e 13%.

A imunofluorescência dos testículos revelou a detecção de células de cracídeos pela marcação do PKH26 red desde períodos iniciais, como imediatamente após e 24 horas após as injeções (Figura 11), até dias após os transplantes (7, 21 e 42 dias - Figuras 12 e 13). Na grande maioria dos casos, as células foram encontradas no interstício, próximas a regiões onde observava-se presença de lesões e vacúolos, possivelmente causados pelas injeções no momento do transplante. Por outro lado, uma minoria das células foi localizada próximas a túbulos seminíferos após 45 dias do transplante. Embora nenhuma ave tenha apresentado espermatogênese durante o período do experimento, nossos resultados demonstraram a presença de células de cracídeos viáveis em 28,13% dos receptores analisados.

Capítulo 2

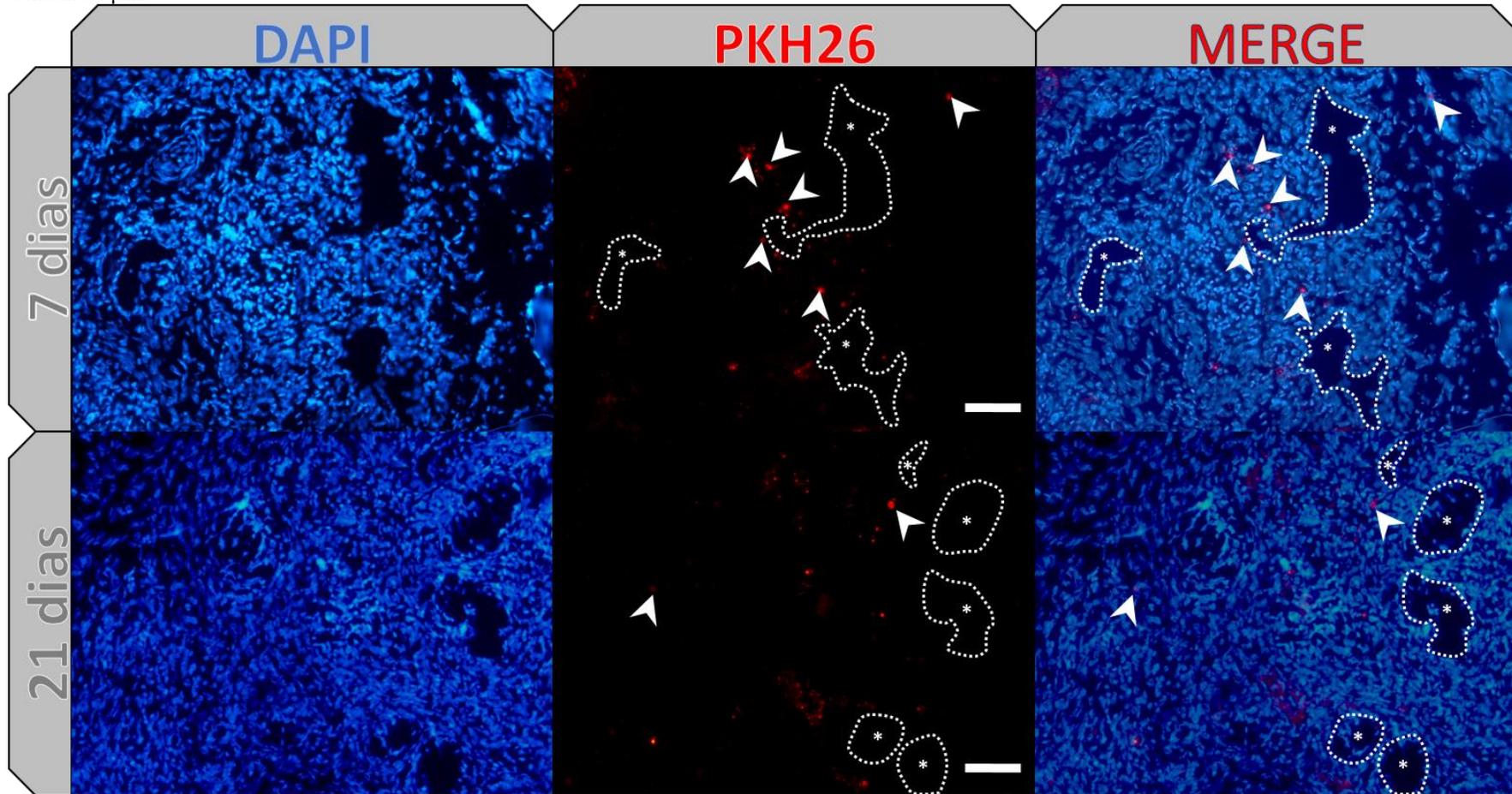
Figura 16 - Avaliação microscópica dos testículos de galo imediatamente (0 hora) e 24 horas após o transplante de células testiculares de cracídeos. Células marcadas foram encontradas na região intersticial do tecido, próximo a lesões teciduais causadas pelas injeções. Setas brancas indicam células testiculares marcadas. As barras de escala representam 50 μm .



Fonte: Blank (2020)

Capítulo 2

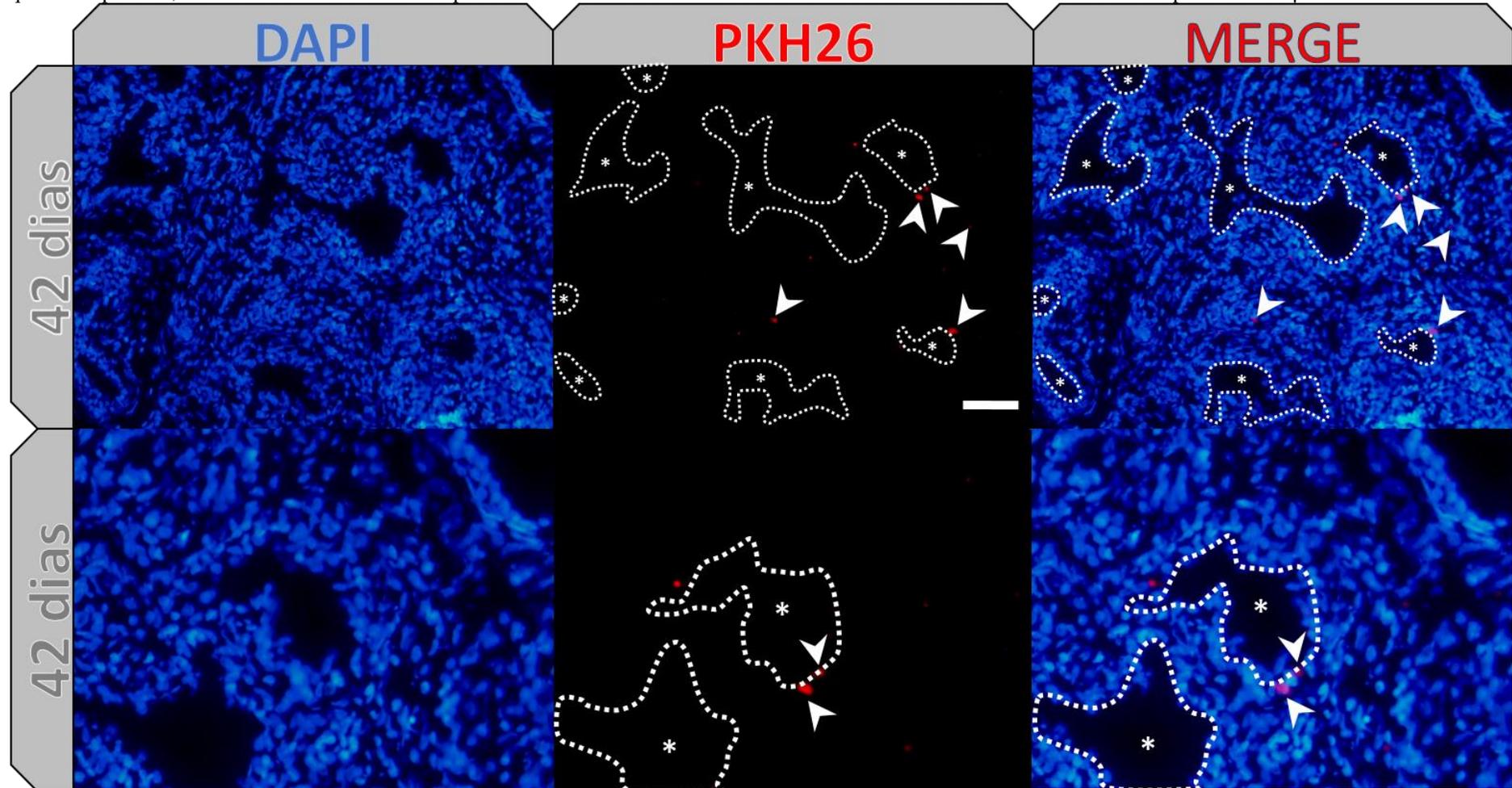
Figura 17 – Avaliação microscópica do testículo de galos 7 e 21 dias após o transplante de células testiculares de cracídeos. Aos 7 dias observamos a reestruturação do tecido testicular com a formação de alguns túbulos seminíferos, mas ainda apresentando lesões causadas pela injeção. Aos 21 dias observamos uma maior reestruturação do tecido com uma diminuição a área lesada pela injeção. As setas brancas indicam células testiculares marcadas, as linhas tracejadas delimitam o lúmen tubular (*). As barras de escala representam 50 μ m.



Fonte: Blank (2020)

Capítulo 2

Figura 18 - Avaliação microscópica do testículo de galos 42 dias após o transplante de células testiculares de cracídeos. Aos 42 dias observamos a quase completa reestruturação do tecido testicular. As setas brancas indicam células testiculares marcadas, as linhas tracejadas delimitam o lúmen tubular (*). As imagens inferiores representam inserções dos quadros superiores, indicando com maior detalhe o posicionamento das células testiculares no túbulo seminífero. As barras de escala representam 50 μ m.

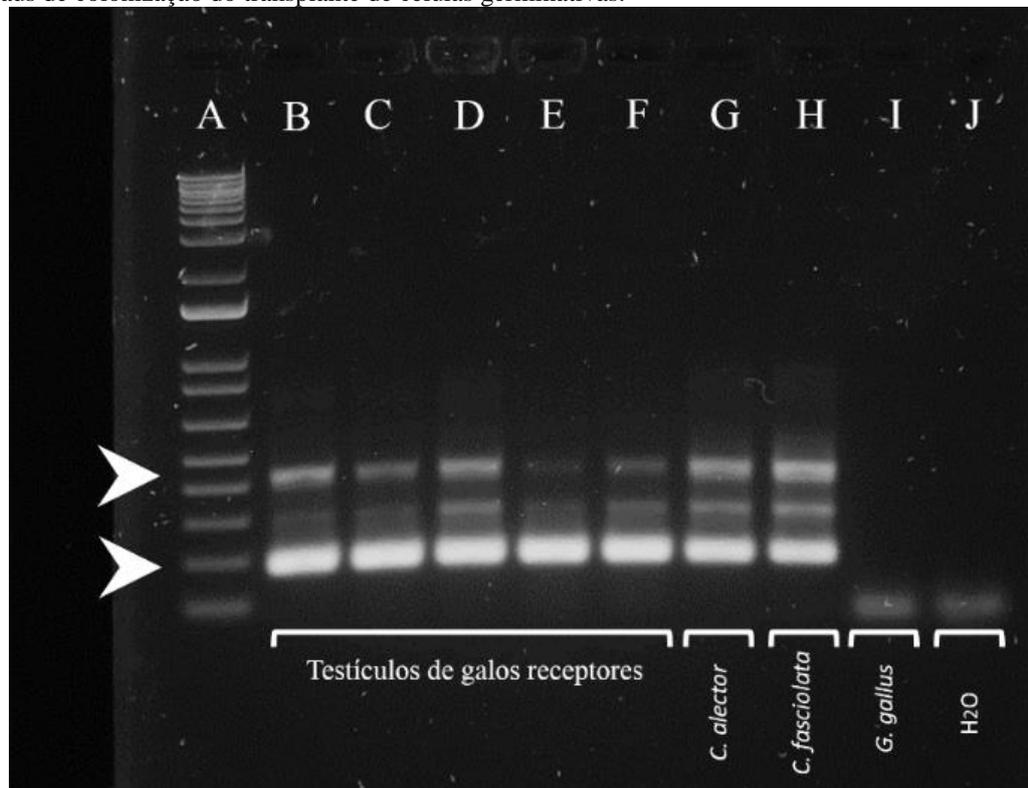


Fonte: Blank (2020)

Capítulo 2

Por outro lado, através da análise de DNA do tecido testicular foi possível detectar a presença do DNA de cracídeos em 30% das aves receptoras (quando analisadas apenas uma amostra por receptor). Além disso, o DNA genômico de cracídeos foi detectado imediatamente após a entrega das células no testículo até 120 dias após o transplante xenogênico (Figuras 14-17).

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para *C. alector* e *C. fasciolata* através de Nested PCR. (A) Peso molecular com escala de 100 pb; DNA de galos receptores, (B) amostra do tempo 0 e (C-F) 24 horas após o transplante. (G e H) Amostras de controles positivos com DNA de *Crax alector* e *Crax fasciolata*, respectivamente. (I) Amostras controle negativo com DNA de galo não transplantado. (J) Controle negativo com H₂O. As setas indicam a posição dos amplicons externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). Todos os testículos receptores (B-F) mostraram a presença de material genético de cracídeo, porém as bandas de amplicons (externo) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas.

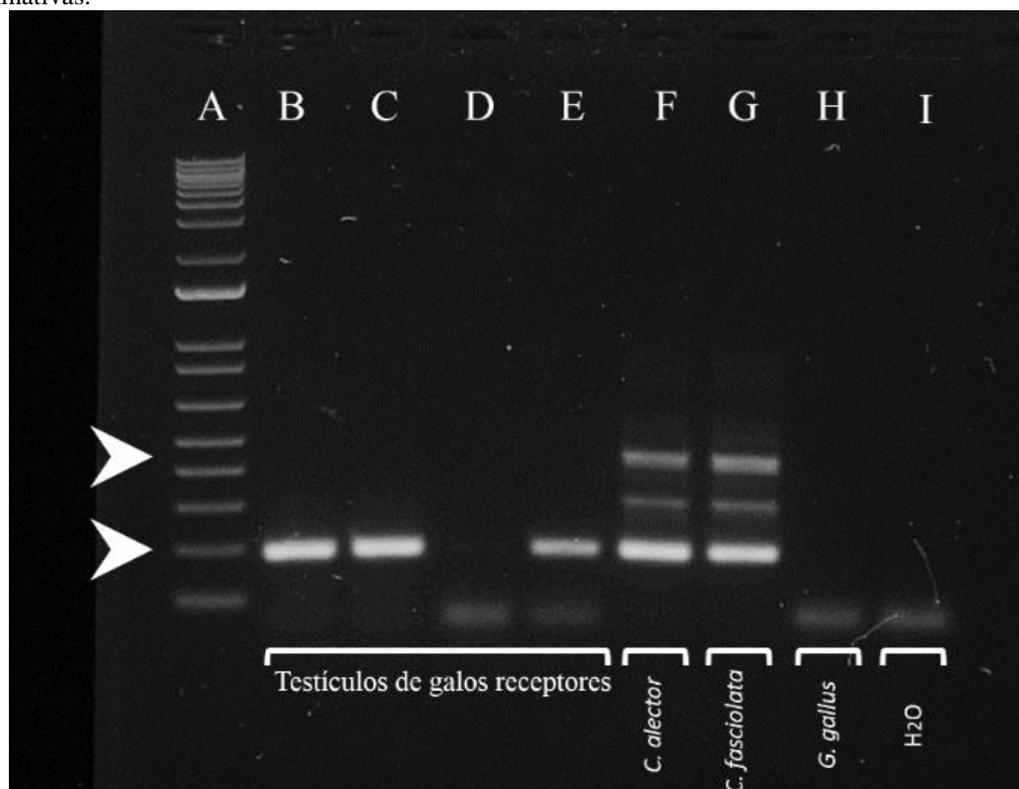


Fonte: Blank (2020)

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para *C. alector* e *C. fasciolata* através de Nested PCR. (A) Peso molecular com escala de 100 pb. DNA de galos receptores, (B-E) amostras de 7 dias após o transplante. (G, F) Amostras de controles positivos com DNA de *Crax alector* e *Crax fasciolata*. (H) Amostra controle negativo com DNA de galo não transplantado. (I) Controle negativo com H₂O. As setas indicam a posição dos amplicons externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). Todos os testículos receptores (B-E) mostraram a presença de material genético de cracídeo, porém as bandas de

Capítulo 2

amplicons (interno) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas.

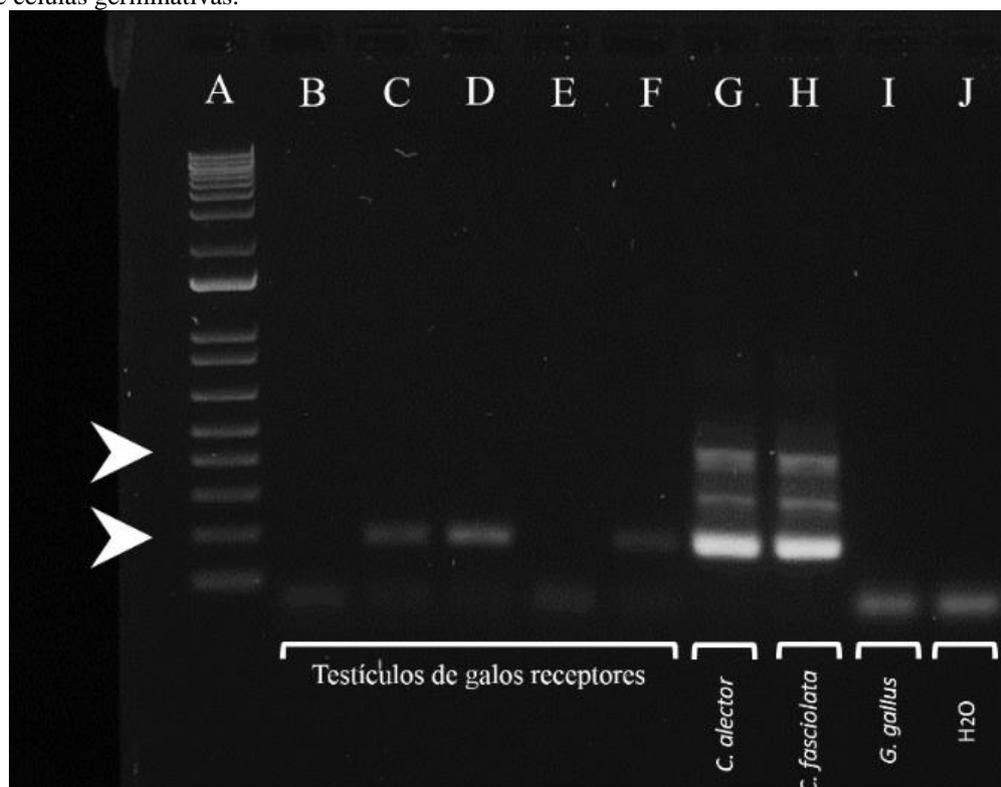


Fonte: Blank (2020)

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para *C. alector* e *C. fasciolata* através de Nested PCR. (A) Peso molecular com escala de 100 pb. (B-F) DNA dos galos receptores, amostras de 21 dias após o transplante; (G, H) Amostras de controles positivos com DNA de *Crax alector* e *Crax fasciolata*, respectivamente. (I) Amostra controle negativo com DNA de galo não transplantado. (J) Controle negativo com H₂O. As setas indicam a posição dos amplicons externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). Testículos receptores (C, D e F) mostraram a presença de material genético de cracídeo, porém

Capítulo 2

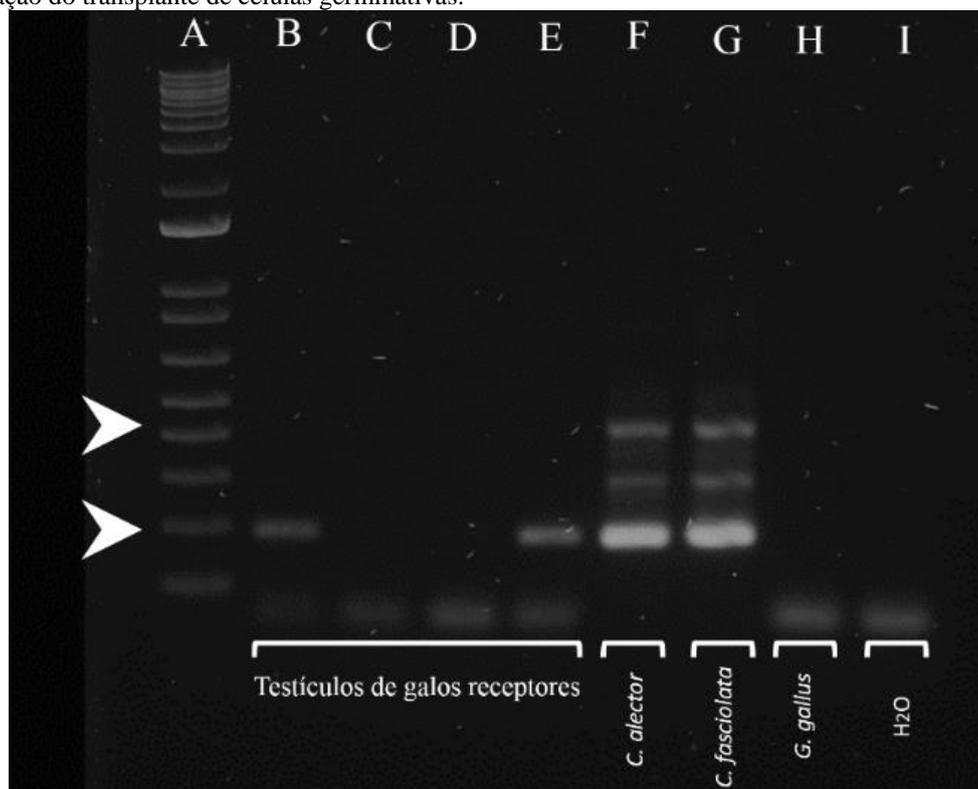
as bandas de amplicons (interno) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas.



Fonte: Blank (2020)

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose de 1,5% para amplicons da região correspondente do citocromo b para *C. alector* e *C. fasciolata* através de Nested PCR. (A) Peso molecular com escala de 100 pb. DNA dos galos receptores, (B, C) testículos de 42 dias e (D, E) 120 dias após o transplante. (F, G) Amostras de controles positivos com DNA de *Crax alector* e *Crax fasciolata*, respectivamente. (H) Amostra de controle negativo com DNA de galo não transplantado. (I) Controle negativo com H₂O. As setas indicam a posição dos amplicons externos e internos (560 pb e 184 pb, respectivamente). Testículos receptores (A e E) mostraram a presença de material genético de

cracídeo, porém as bandas de amplicons (interno) exibiram intensidades diferentes, sugerindo diferentes graus de colonização do transplante de células germinativas.



Fonte: Blank (2020)

4.4. DISCUSSÃO

Estudos prévios têm demonstrado que o galo doméstico (*Gallus gallus*) representa um excelente recipiente para transplantes intra e interespecíficos de células-tronco espermatogoniais (SSCs) de aves filogeneticamente próximas (Lee et al., 2006; Trefil et al., 2006; Trefil et al., 2010; Pereira et al., 2013; Roe et al., 2013; Benesova et al., 2014). Estes achados nos motivaram a investigar se o ambiente testicular do galo garante a colonização e desenvolvimento de células germinativas utilizando um modelo filogeneticamente mais distante. Assim, no presente estudo investigamos o sucesso do transplante xenogênico utilizando *Crax alector* e *Crax fasciolata* (representantes mais comuns da família Cracidae) como espécies doadoras e o galo-doméstico (da família Phasianidae) como espécie receptora. Embora as células transplantadas não tenham apresentado capacidade de proliferação e tampouco se diferenciaram em espermátides e espermatozoides durante o período avaliado,

Capítulo 2

nossos achados revelam que células descongeladas de cracídeos foram capazes de se manterem viáveis em testículos depletados com bussulfano por até 120 dias após o transplante.

A geração de proles através de transplantes alogênicos de SSCs já foi demonstrado em diferentes espécies de aves (i.e., entre galos e codornizes) (Trefil et al., 2006; Kim et al., 2018). Contudo, até o momento a utilização de transplantes xenogênicos ainda não foi comprovado através de testes de progênie mesmo após Pereira et al. (2013) e Roe et al. (2013) terem reportado que células de codornizes são capazes de colonizar as gônadas de embriões de galinha, como também manter a espermatogênese após o transplante utilizando galos adultos. De fato, até mesmo em peixes cuja eficiência dos xenotransplantes são maiores do que em aves e mamíferos devido a notável plasticidade que o microambiente somático fornece na colonização, sobrevivência, proliferação e diferenciação das SSCs (Silva et al., 2016), a obtenção de proles a partir de transplantes xenogênicos ainda é um desafio em espécies filogeneticamente distantes. Por essa razão, inúmeros trabalhos vêm estudando os processos de organização, auto-renovação e diferenciação das SSCs mediados pelas estruturas que compõem o nicho testicular (Oatley e Brinster, 2012; Svingen e Koopman, 2013; Takashima e Shinohara, 2013; de Rooji, 2017; Lorde e Oatley, 2017; Potter e DeFalco, 2017; Kitadate et al., 2019).

Além da barreira filogenética natural, outro fator que afeta diretamente o sucesso dos transplantes celulares é a preparação das aves receptoras. Embora estudos anteriores já tenham demonstrado a aplicabilidade do bussulfano na depleção de células endógenas (Hermann et al., 2007; Nobrega et al., 2010; Pérez-Crespo et al., 2011), não há estudos mais abrangentes sobre seu efeito citotóxico sobre o nicho testicular em aves receptoras, uma abordagem que em mamíferos provou afetar a secreção de proteínas específicas das células de Sertoli e, subsequentemente, a capacidade destas células apoiarem a diferenciação das SSCs (Maguire et al. 1993; McKinnell e Sharpe 1997; Jonsson et al. 1999). Além disso, a utilização do bussulfano afeta diretamente as células de Leydig e, por conseguinte, a produção de testosterona e, a

Capítulo 2

espermatogênese (Viguiet-Martinez et al., 1984; Boujrad et al., 1995a; Boujrad et al., 1995b; Smith et al., 2015). Ainda que a produção de espermatozoides pode ser parcialmente recuperada em galos tratados com 10 e 20 mg /kg de bussulfano, a utilização de doses maiores como 40 mg/ kg pode levar a um dano mais persistente à espermatogênese (Blank et al., capítulo 1) e, representar um problema sério ao nicho espermatogonial, uma vez que o retorno e expansão da SSC dependem muito das células de suporte somáticas (ou seja, células de Sertoli, Leydig e mióides) (Oatley e Brinster, 2012). Portanto, acreditamos que a utilização de doses mais elevadas (ou seja, 30 mg / kg) de bussulfano podem ter afetado as populações de células somáticas de suporte nos testículos de galos e, em última análise, prejudicado a colonização, sobrevivência, proliferação e diferenciação das SSCs.

Adicionalmente, outro fator preponderante no sucesso do transplante interespecífico é a capacidade das células germinativas diferenciarem e manterem a capacidade fecundante mesmo após a criopreservação/descongelamento e transplante. Dessa forma, apesar de comprovada a capacidade de diferenciação e fertilização das SSCs criopreservadas após o transplante alogênico em galos (Benesova et al., 2014), atualmente, os métodos de criopreservação e descongelamento não são completamente seguros para as células tronco testiculares (Gholami et al., 2013). Um exemplo disso é a alta queda na viabilidade das espermatogônias tronco testiculares de galos durante o processo de criopreservação/descongelamento (Benesova et al., 2014). Além disso, o processo de criopreservação induz lesões criogênicas que interrompem a função biológica normal destas células. Tais interrupções incluem estresse osmótico e oxidativo que, em última análise, leva à disfunção mitocondrial, fragmentação de DNA e, indução da apoptose (Ha et al., 2016). Por essa razão, agentes crioprotetores intracelulares (ACI) e externos (ACE) são utilizados na tentativa de minimizar tais lesões. Contudo, alguns aditivos crioprotetores como Dimetilsulfóxido (DMSO), Polivinilpirrolidona (PVP) e etileno-glicol têm levado à redução da expressão de transcrição de alguns genes (CXCR4, POU5F1, VASA e

Capítulo 2

SOX2) relacionados à transmissão da linha germinativa em células germinativas de peixes (Riesco e Robles, 2013). Curiosamente, em modelos murinos o DMSO é considerado o ACI mais eficaz na proteção das SSCs durante a criopreservação (Lee et al., 2013b). Tais divergências podem indicar uma susceptibilidade espécie-específica ao processo criogênico, sugerindo estudos específicos a cada espécie utilizada. Em nosso estudo, a utilização do DMSO não evitou a drástica queda na viabilidade celular após a criopreservação/descongelamento, além disso a ausência de proliferação e diferenciação das células pode sugerir que o ACI utilizado talvez não tenha proporcionado uma proteção efetiva as células de cracídeos, afetando a expressão de fatores pró germinativos.

A concentração e volume da suspensão celular injetada por testículo apresenta ampla variação de acordo com o modelo de transplante empregado em aves. No geral, a concentração celular muda de acordo com a acessibilidade às células doadoras e eficiência das técnicas de recuperação, seleção e cultivo pré-transplante. Dessa forma, se tratando de um modelo não convencional de transplante, utilizando aves raras como doadoras, um limitante em nosso modelo foi o reduzido número de célula doadoras obtidas ao longo do experimento. Tais circunstâncias nos levaram a adotar uma estratégia de não realizar o plaqueamento diferencial devido à alta perda celular (i.e., recuperação de apenas 3,1% das células da digestão enzimática; Pereira et al., 2013) e, realizar o transplante utilizando o extrato bruto de células (contendo além das células germinativas, células somáticas como Sertoli, Leyding, mióides etc). Segundo Dobrinski e Travis, 2007 o ambiente testicular de animais receptores muitas vezes parece ser incapaz de suportar a diferenciação espermatogênica. Contudo, essa incompatibilidade das células germinativas ao ambiente testicular pode ser contornada pelo co-transplante de células germinativas e células somáticas (Célula de Sertoli) no testículo receptor. Além disso, diferentemente do modelo mamíferos cujo transplante celular é realizado através da canulação do ducto eferente e/ou rede testis (Aponte, 2015), nas aves, devido as particularidades

Capítulo 2

anatômicas e morfológicas do tecido testicular, injetamos a suspensão celular no parênquima que, por conseguinte, pode ocasionar a perda de células para interstício. Tal circunstância pode ter contribuído na grande maioria das regiões marcadas com PKH26 serem no interstício testicular. Não obstante, nossos resultados indicam que mesmo optando em não realizar o plaqueamento utilizando o extrato bruto de células, não foi possível observar multiplicação e diferenciação, sugerindo que talvez o número de células utilizadas não tenha sido o suficiente e, a necessidade de elaborar métodos de seleção e cultivo *in vitro* sejam cruciais para que possamos progredir.

Em mamífero, estudos têm demonstrado que a diferenciação das SSCs ocorre aproximadamente 2 semanas após o transplante celular devido ao período necessário para a colonização do epitélio seminífero (Parreira et al., 1998; Nagano et al., 1999; Ohta et al., 2000; Ishii et al., 2014). Em transplantes xenogênicos em aves, Pereira et al. (2013) reportaram que a espermatogênese só foi possível ser observada 5 semanas após o transplante, um aumento de aproximadamente 3 vezes no tempo do ciclo espermato gênico natural da espécie doadora (*Coturnix coturnix*; Lin e Jones, 1992). No presente estudo, o tempo necessário para as células de cracídeo completarem a espermatogênese em testículos de galo não foi estimado devido à ausência de diferenciação celular no período avaliado (i.e., 150 dias). Embora esse tempo possa ser bastante longo, o tempo necessário até a produção de espermatozoides utilizando aves jovens como receptoras é muito mais longo (188 dias) em comparação a transplantes de células tronco utilizando aves adultas (35 dias) como receptoras (Lee et al., 2006; Trefil et al., 2006). Para avaliar se a duração da espermatogênese em cracídeos é maior do que em codornas e galos, ou se suas SSCs precisam de um tempo mais longo para colonizar e diferenciar dentro dos testículos de galos, ou até mesmo se a criopreservação afeta a diferenciação destas células, novos estudos precisam ser desenvolvidos a respeito.

No presente estudo, demonstramos que o microambiente somático de testículos imunossuprimidos de galos é capaz de suportar a colonização e sobrevivência de células testiculares de cracídeos submetidas a criopreservação e descongelamento. A novidade em nosso trabalho está relacionada na distância filogenética entre doador e receptor, sendo espécies de diferentes famílias que divergiram a aproximadamente 40 milhões de anos (Prum et al., 2015). Embora não tenhamos observado diferenciação e produção de espermatozoides derivados das células doadoras, achados utilizando células germinativas testiculares de humanos e primatas não humanos em receptores roedores (Nagano et al., 2002; Honaramooz et al., 2004) nos indicam que as células germinativas apresentam uma notável plasticidade frente a transplante xenogênicos filogeneticamente distantes. Contudo, para que possamos progredir, maiores estudos sobre a preparação de aves receptoras, assim como novas alternativas de receptores (por exemplo, embriões, aves híbridas ou geneticamente modificadas) e protocolos de criopreservação precisam ser testados. Além disso, um protocolo de cultivo *in vitro* de SSC de cracídeos precisa ser elaborado.



Referência Bibliográfica

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aige-Gil V, Simkiss K. Sterilisation of avian embryos with busulphan. *Res Vet Sci* 1991;50:139–44.
- Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 2008;29:469-487.
- Aponte PM. Spermatogonial stem cell: current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2015;7:669-80.
- Arnand S, Bhartiya D, Sriraman K, Mallick A. Underlying mechanisms that restore spermatogenesis on transplanting healthy niche cells in busulphan treated mouse testis. *Stem Cell Rev* 2016;12:682-97.
- Balis F. The Challenge of Developing New Therapies for Childhood Cancers. *Oncologist* 1997;2:I-II.
- Bhartiya D, Arnand S. Effects of oncotherapy on testicular stem cell and nich. *Mol Hum Reprod* 2017;23:654-55.
- Benesova B, Mucksova J, Kalina J, Trefil P. Restoration of spermatogonial in infertile male chickens after transplantation of cryopreserved testicular cells. *British Poultry Science* 2014;55:837–45.
- Berg C, Halldin K, Fridolfsson AK, Brandt I, Brunstrom B. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Sci. Total. Environ* 1999;233:57–66.
- Bernardo AM, Sprenkels K, Rodrigues G, Noce T, Lopes SMCS. Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation. *Biology open* 2012;1146-1152
- Bertocchini F, Skromne I, Wolpert L, Stern CD. Determination of embryonic polarity in a regulative system: evidence for endogenous inhibitors acting sequentially during primitive streak formation in the chick embryo. *Development* 2004;131:3381–3390.
- Bertocchini, F, Stern CD. Gata2 provides an early anterior bias and uncovers a global positioning system for polarity in the amniote embryo. *Development* 2012;139:4232–4238.
- Bertocchini F, Lopes SMCS. Germline development on amniotes: A paradigma shift in primordial germ cell specification. *BioEssays* 2016;38:791-800.
- Beverdam A, Koopman P. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Human Molecular Genetics* 2005;15:417-31.
- BirdLife International. Saving the world's most threatened birds: the BirdLife Preventing Extinctions Programme. Cambridge, UK: BirdLife International, 2013.
- Blanco JM, Gee G, Wildt DE, Donoghue a M. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod* 2000;63:1164–71.
- Blanco JM, Wildt DE, Höfle U, Voelker W, Donoghue AM. Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. *Theriogenology* 2009;77:200-13.
- Blesbois E, Seigneurin F, Grasseau I, Limouzin C, Besnard J, Gourichon D, Coquerelle G, Rault P, Tixier-Boichard M. Semen Cryopreservation for *Ex Situ* Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poult. Sci* 2007a;86:555–64.
- Blesbois E. Current status in avian semen cryopreservation. *Worlds Poult Sci J* 2007;63:213–

- 22.
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 2008; 69:252–61.
- Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, et al. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 1989;243:533–5.
- Boujrad N, Reviers MTH, Kamtchouing P, Perreau C, Carreau S. Evolution of somatic and germ cell populations after busulfan treatment in utero or neonatal cryptorchidism in the rat. *Andrologia* 1995;27:223–8.
- Boujrad N, Hochereau-de Reviers MT, Carreau S. Evidence for germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat. *Biol Reprod* 1995;53:1345–52.
- Bozkurt HH, Aktaş A, Ulkay MB, Firat UB. Sertoli cell proliferation during the post hatching period in domestic fowl. *J Vet Sci* 2007;8:219–22.
- Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Dev Biol* 1994;91:11298–302.
- Brown JL, Ph D, Walker S, Steinman K, Royal F. *Endocrine Manual for Reproductive Non-Domestic Species*. Smithsonian's Natl Zool Park Conserv Res Cent Endocr Workb 2004:69.
- Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe VY, Pholpramool C, et al. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod* 2005;73:1011–6.
- Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 1987;176:259–68.
- Burrows WH, Quinn JP. The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poult Sci* 1937;16:19–24.
- Cai Y, Liu T, Fang F, Shen S, Xiong C. Involvement of ICAM-1 impaired spermatogonial after busulfan treatment in mice. *Andrologia* 2016;48:37-44.
- Caires KC, de Avila J, McLean DJ. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction* 2009;138:667-77.
- Cañón S, Herranz C, Manzanares M. Germ cell restricted expression of chick Nanog. *Dev Dyn* 2006;235:2889–94.
- Carscience RS, Clark ME, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 1993; 117: 669–75.
- Chen LY, Bron PR, Willis WB, Eddy EM. Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance. *Endocrinology* 2014;155:4964-74
- Chen LY, WillisWB, Eddy EM. Targeting the Gdnf gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:1829-1834.
- Chen YC, Lin SP, Chang YY, Chang WP, Wei LY, Liu HC, Huang JF, Pain B, W SC. In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poultry Science* 2018;98:1820-32.
- Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung J Il, Kim HC, Yeo SM, et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. *FEBS Lett* 2004;575:41–51.
- Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996;381:418-21.

Referência bibliográfica

- Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cell from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999;61:1331–39.
- Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57:270–79.
- Dobrinski I, Travis AJ. Germ cell transplantation for the propagation of companion animals, non-domestic and endangered species. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:732–9.
- Dobrinski I. Male germ cell transplantation. *Reprod Domest Anim* 2008;43 Suppl 2:288–94.
- DeFalco T, Potter SJ, Williams AV, Waller B, Kan MJ, Capel B. Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell Rep* 2015;12:1107-19.
- de Rooij DG. The natural dynamics of spermatogonial stem cell. *Development* 2017;144:3022-30.
- Ding LJ, Yan GJ, Ge QY, Yu F, Zhao X, Diao ZY, Wang ZQ, Yang ZZ, Sun HX, Hu YL. FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. *FEBS Letters* 2011;585:2437-44.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zoology* 1993;265:432–37.
- Ebata KT, Zhang X, Nagano MC. Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol Reprod Dev* 2005;72:171–81.
- Eyal-Gilardi H, Kochav. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: I. General morphology. *Development Biol* 1976;49:321-37.
- Fisher D, Neumann D, Purchase C, Bouts T, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M. The use of semen evaluation and assisted reproduction in spix's macaws in terms of species conservation. *Zoo Biol* 2014;33:234–44.
- Fujihara M, Kim S-M, Minami N, Yamada M, Imai H. Characterization and in vitro culture of male germ cells from developing bovine testis. *J Reprod Dev* 2011;57:355–64.
- Galetti M, Guevara R, Côrtes MC, Fadini R, Matter SV, Leite AB, Labacca F, Ribeiro T, Carvalho CS et al. Functional Extinction of birds drives rapid evolutionary changes in seed size. *Science* 2013;340.
- Gassei K, Orwig KE. SALL4 Expression in Gonocytes and Spermatogonial Clones of Postnatal Mouse Testes. *PLoS One* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0053976.
- Gholami M, Hemadi M, Saki G, Zendedel A, Khodadadi A, Mohammadi-Asl J. Does prepubertal testicular tissue vitrification influence spermatogonial stem cell (SSCs) viability? *Journal of assisted reproduction and genetics* 2013;30:1271-77.
- Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. *Poult. Sci* 1997;76:91–95.
- Ginsburg M, Eyal-Giladi H. Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol* 1986;95:53–71.
- Ginsburg M, Eyal-Giladi H. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development* 1987;101:209–219.
- Goel S, Fujihara M, Minami N, Yamada M, Imai H. Expression of NANOG, but not POU5F1, points to the stem cell potential of primitive germ cells in neonatal pig testis. *Reproduction* 2008;135:785–95.
- Goel S, Reddy N, Mahla RS, Suman SK, Pawar RM. Spermatogonial stem cells in the testis of an endangered bovid: Indian black buck (*Antelope cervicapra L.*). *Anim Reprod Sci* 2011;126:251–7.
- González R, Dobrinski I. Beyond the mouse monopoly: Studying the male germ line in domestic animal models. *ILAR J* 2015;56:83–98.

- Griswold MD. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biol Reprod* 2018;99:87-100.
- Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nature Protocols* 2009;4:143-154.
- Ha SJ, Kim BG, Lee YA, Kim YH, Kim BJ, Jung SE, Pang MG, Ryu BY. Effect of antioxidants and apoptosis inhibitors on cryopreservation of murine germ cells enriched for spermatogonial stem cell. *PLoS ONE* 2016;11:e0161372.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn* 1992;195:229-75.
- Han JY, Lee HC, Park TS. Germline-competent stem cell in avian species and its application. *Asian Jour of Androl* 2015;17:421-426.
- Han JY. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009;32:61-80.
- Hermann BP, Sukhwani M, Lin C-C, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, et al. Characterization, Cryopreservation, and Ablation of Spermatogonial Stem Cells in Adult Rhesus Macaques. *Stem Cells* 2007;25:2330-8.
- Hirabayashi M, Yoshizawa Y, Kato M, Tsuchiya T, Nagao S, Hochi S. Availability of subfertile transgenic rats expressing the c-myc gene as recipients for spermatogonial transplantation. *Transgenic Res* 2009;18:135-41.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; Influence of GDNF. *Dev Biol* 2005;279:114-24.
- Honaramooz A, Li MW, Penedo MCT, Meyers S, Dobrinski I. Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice. *Biol Reprod* 2004;70:1500-03.
- Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, Blash S, Ayres S, Azuma C, et al. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl* 2005;26:698-705.
- Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1 dependent pathway. *FASEB J* 2009;2076-87.
- Hutson JC. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tissue Res* 1992;267:385-389.
- Intarapat S, Stern CD. Chick stem cells: current progress and future prospects. *Stem cell Research* 2013;11:1378-92.
- Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Cell-cycle-dependent colonization of mouse spermatogonial stem cells after transplantation into seminiferous tubules. *J. Reprod. Dev* 2014; 60:37-46.
- IUCN. Red List statistics, <http://iucnredlist.org>.
- Iwamoto T, Hiraku Y, Oikawa S, Mizutani H, Kojima M, Kawanishi S. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Sci* 2004;95:454-8.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Human Reprod* 2007;22:1060-1067.
- Johnston DS, Olivas E, DiCandeloro P, Wright WW. Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: A possible regulation of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol Reprod* 2011;4:763-69.
- Jonson CK, Zetterstrom RH, Holst M, Parvinen M, Soder O. Constitutive expression of interleukin-1 alpha messenger ribonucleic acid in rat Sertoli cells is dependent upon interaction with germ cells. *Endocrinology* 1999;140:3755-3761.
- Jung JG, Lee YM, Park TS, Park SH, Lim JM, et al. Identification, culture, and

Referência bibliográfica

- characterization of germline stem cell-like cells in chicken testes. *Biol Reprod* 2007;76: 173–82.
- Jung JG, Lee YM, Kim JN, Kim TM, Shin JH, et al. The reversible developmental unipotency of germ cells in chicken. *Reproduction* 2010;139:113–9.
- Kang SJ, Choi JW, Kim SY, Park KJ, Kim TM, Lee YM, et al. Reproduction of Wild Birds via Interspecies Germ Cell Transplantation1. *Biol Reprod* 2008;79:931–7.
- Kang SJ, Choi JW, Park KJ, Lee YM, Kim TM, Sohn SH, Lim JM, Han JY. Development of a pheasant interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: effect of donor cell sex, on chimeric semen production. *Theriogenology* 2009;72:519–27.
- Karagenc L, Cinnamon Y, Ginsburg M, Petite J.N. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet* 1996;19:290–301.
- Kim JH, Jung-Ha HS, Lee HT, Chung KS. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev* 1997;46:515–26.
- Kim YM, Park JS, Yoon JW, Choi HJ, Park KJ, Ono T, Han JY. Production of germline chimeric quails following spermatogonial cell transplantation in busulfan-treated testis. *A Jour of Androl* 2018;20:414–16.
- Kitadate Y, Jorg D, Tokue M, Maruyama A, Ichikawa R, Tsuchiya S et al. Competition for mitogens regulates spermatogonial stem cells homeostasis in an open niche. *Cell Stem Cell* 2019;24:79-92.
- Kong LQ, Qiu L, Chen Y, Zhang X, Chen B, Zhang Y, Chang G. Long-term in vitro culture and preliminary establishment of chicken primordial germ cell lines. *PLoS ONE* 2018;13:e0196459
- Kuijk EW, van Mil A, Brinkhof B, Penning LC, Colenbrander B, Roelen B a J. PTEN and TRP53 independently suppress Nanog expression in spermatogonial stem cells. *Stem Cells Dev* 2010a;19:979–88.
- Kuijk EW, de Gier J, Chuva de Sousa Lopes SM, Chambers I, van Pelt AMM, Colenbrander B, et al. A distinct expression pattern in mammalian testes indicates a conserved role for NANOG in spermatogenesis. *PLoS One* 2010b;5.
- Lavial F, Acloque H, Bertocchini F, MacLeod DJ, Boast S, Bachelard E, et al. The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development* 2007;134:3549–63.
- Lavial F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J, et al. Ectopic expression of Cvh (chicken vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev Biol* 2009;330:73–82.
- Lee YM, Jung JG, Kim JN, Park TS, Kim TM, Shin SS, Kang DK, Lim JM, Han JY. A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes. *Biol Reprod* 2006;75:380–86.
- Lee HC, Kim SK, Park TS, Rengaraj D, Park KJ, Lee HJ, et al. Compensatory proliferation of endogenous chicken primordial germ cells after elimination by busulfan treatment. *Stem Cell Res Ther* 2013;4.
- Lee YA, Kim YH, Kim BJ, Jung MS, Auh JH, Seo JT, et al. Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol. *Biology of reproduction*. 2013b; 89(5):109.
- Lee HJ, Yoon JW, Jung KM, Kim YM, Park JS, Youn HP, Rengaraj D, Han JY. Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial cells for avian sexing model development. *FASEB journal* 2019;33:1-11.
- Leighton PA, van de Lavoie MC, Diamond JH, Xia C, Etches RJ. Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 1163–75.
- Li ZD, Deng H, Liu CH, Song YH, Sha J, Wang N, Wei H. Production of duck- chicken

Referência bibliográfica

- chimeras by transferring early blastodermal cells. *Poult. Sci* 2002;81:1360-64.
- Lin M, Jones RC. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Cell and Tissue Research* 1992;267:591-601.
- Liu C, Khazanehdari KA, Baskar V, Saleem S, Kinne J, Wernery U, et al. Production of Chicken Progeny (*Gallus gallus domesticus*) from Interspecies Germline Chimeric Duck (*Anas domesticus*) by Primordial Germ Cell Transfer. *Biol Reprod* 2012;86.
- Lobba ARM, Forni MF, Carreira ACO, Sogayar MC. Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. *Cytometry A* 2012;81:1084-91.
- Lord T, Oatley JM. Revised A-single model to explain stem cell dynamics in the mouse male germline. *Reproduction* 2017;154:55-64.
- Macdonald J, Glover JD, Taylor L, Sang HM, McGrew MJ. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One* 2010; 5: e15518.
- Maguire SM, Millar MR, Shape RM, Saunders PT. Stage-dependent expression of mRNA for cyclic protein 2 during spermatogenesis is modulated by elongated spermatids. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 94:79-88.
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2004;5:728-33.
- McKinnell C, Shape RM. Regulation of the secretion and synthesis of rat Sertoli cell SGP1, SGP-2 and CP-2 by elongated spermatids. *Int J Androl* 1997;20:171-79.
- Motono M, Yamada Y, Hattori Y, Nakagawa R, Nishijima K, Iijima, S. (2010). Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 315-321.
- Mozdziak PE, Angerman-Stewart J, Rushton B, Pardue SL, Petite J N. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci* 2005;84:594-600.
- Mucksová J, Kalina J, Bakst M, Yan H, J.P.Brillard, Benešová B, et al. Expression of the chicken GDNF family receptor α -1 as a marker of spermatogonial stem cells. *Anim Reprod Sci* 2013;142:75-83.
- Nobrega RH, Greebe CD, Kant HV, Bogerd J, França LR, Schulz RW. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS ONE* 2010;5:e12808.
- Nagano M, Avarbock, MR, Brinster LR. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol. Reprod* 1999;60:1429-1436.
- Nagano M, Mccarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cell colonize mouse testes. *Biol Repro* 2001;64:1409-16.
- Nagano M, Patrizio P, Brinster RL. Long-term survival of human spermatogonial stem cell in mouse testes. *Fertil Steril* 2002;78:1225-33.
- Nakamura M, Yoshinaga K, Fujimoto T. Histochemical identification and behavior of quail primordial germ cells injected into chick embryos by the intravascular route. *J. Exp. Zool* 1992;261:479-483.
- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult. Sci* 2007;86:2182-2193.
- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Atsumi Y, Ito Y, Ono T, et al. Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chickens. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:900-7.

Referência bibliográfica

- Nakamura Y, Usui F, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol. Reprod* 2010a;83:130–37.
- Nakamura Y, Usui F, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, et al. Germline Replacement by Transfer of Primordial Germ Cells into Partially Sterilized Embryos in the Chicken1. *Biol Reprod* 2010b;83:130–7.
- Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Watanabe H, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Viability and functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chickens. *J. Poult. Sci* 2011;48:57–63.
- Nakamura Y, Kagami H, Tagami T. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cell. *Develop. Growth Differ* 2013;55:20-40.
- Nakanoh S, Fuse N, Takahashi Y, Agata K. Verification of chicken nanog as an epiblast marker and identification of chicken pouv as pou5f3 by newly raised antibodies. *Dev Growth Differ* 2015;57:251–63.
- Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J. Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor-Mediated RET Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate1. *Biol Reprod* 2006;74:314–21.
- Nes WD, Lukyanenko YO, Jia ZH, Quideau S, Howald WN, Pratum TK, et al. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology* 2000;141:953-958.
- Neumann D, Kaleta EF, Lierz MW. Semen collection and artificial insemination in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) – a potential model for Psittacines. *Tierarztl Prax* 2013;41:101-05.
- Niederberger BA, Busada JT, Geyer CB. Marker expression reveals heterogeneity of spermatogonia in the neonatal mouse testis. *Reproduction* 2015;149:329–38.
- Oatley JM, Oatley MJ, Avarboc MR, Tobias JW, Brinster RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* 2009;136:1191-99.
- Oatley JM, Brinster RL. The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes. *Physiol Rev* 2012;92:577–95.
- O’Shaughnessy PJ, Hu L, Baker PJ. Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. *Reproduction* 2008;135:839–50.
- Ogawa T, Dobrinski I, Avarboc MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testis. *Biol Reprod* 1999;60:515-21.
- Ohta H, Yomajida K, Yamahada S, Okabe M, Nishimune Y. Real-time observation of transplanted ‘green germ cell’: proliferation and differentiation of stem cells. *Dev. Growth Differ* 2000;42:105–112.
- Olejnik J, Suchwerska N, Herrid M, Jackson M, Hinch G, Hill JR. Spermatogonia survival in young ram lambs following irradiation, busulfan or thermal treatment. *Small Rumin Res* 2018;166:22-27.
- Ono T, Yokoi R, Aoyama H. Transfer of male or female primordial germ cells of quail into chick embryonic gonads. *Exp. Anim* 1996;45:347–52.
- Ono T, Machida Y. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnix Japonica*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999;122:255–9.
- Park TS, Hong YH, Kwon SC, Lim JM, Han JY. Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ (EG) cells into recipient embryos. *Mol Reprod Dev* 2003;65:389–95.
- Park TS, Han JY. PiggyBac transposition into primordial germ cells is an

Referência bibliográfica

- efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109: 9337–41.
- Park TS, Lee HJ, Kim KH, Kim JS, Han JY. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc Natl Acad Sci* 2014a;111: 12716–21.
- Park TS. Germ Cell, Stem Cell, and Genomic Modification in Birds. *J Stem Cell Res Ther* 2014b;4.
- Parreira GG, Ogawa T, Avarbock MR, França LR, Brinster RL, Russell LD. Development of germ cell transplants in mice. *Biol. Reprod* 1998;59:1360–1370.
- Payerhdar, A., Hosseini, E., Mehrabani, D., Forouzanfer M. Busulfan treatment effects on testicular tissue and serum levels of anti-Mullerian hormone and testosterone in adult mice. *Indones Biomed J* 2017;9:106–12.
- Pereira RJG, Napolitano A, Garcia-Pereira FL, Baldo CF, Suhr ST, King LE, et al. Conservation of avian germplasm by xenogeneic transplantation of spermatogonia from sexually mature donors. *Stem Cells Dev* 2013;22:735–49.
- Pérez-Crespo M, Pericuesta E, Pérez-Cerezales S, Arenas MI, Lobo MVT, Diaz-Gil JJ, Gutierrez-Adan A. Affect of liver growth factor in both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated mice. *Repro Biol Endocrino* 2011;9.
- Perry MM. 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*;331:70–72.
- Petitte JN, Clark ME, Liu G, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 1990;108:185–9.
- Petitte JN, Karagenc L, Ginsburg M. The origin of the avian germ line and transgenesis in birds. *Poult. Sci* 1997;76:1084–1092.
- Potter SJ, DeFalco T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction* 2017;153:151-162.
- Prum RO, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM, Lemmon AR. A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature* 2015;526.
- Riesco MF, Robles V. Cryopreservation causes genetic and epigenetic changes in zebrafish genital ridges. *PLoS ONE* 2013;8:e67614.
- Roe M, Mcdonald N, Durrant B, Jensen T. Xenogeneic transfer ad adult quail (*Coturnix coturnix*) spermatogonial stem cell to embryonic Chicken (*Gallus gallus*) Host: A model for avian conservation. *Biol. Reprod* 2013;88:1–7.
- Russell LD, Brinster RL. Ultrastructural observation of spermatogenesis following trasnplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J Androl* 1996;17:615-27.
- Russel LD, Griswold MD. Spermatogonial transplantation – an update for the Millennium. *Mol. Cell. Endocrinol* 2000;161:117-20.
- Russell J, Kangaroo S. Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan in Transplantation. *Curr Pharm Des* 2008;14:1936–49.
- Saint Jalme M, Lecoq R, Seigneurin F, Blesbois E, Plouzeau E. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: The first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology* 2003;59:875–88.
- Savvlidi F, Ptacel M, Vargova KS, Stadnik L. Manipulation of permatogonial stem cell in livestock species. *Journ Anim Sci Biotech* 2019;10:2-18.
- Schusser B, Collarini EJ, Yi H, Izquierdo SM, Fesler J, et al. Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 20170–5.
- Silva MA, Costa GMJ, Lacerda SMSN, Brandão-Dias PFP, Kalapothakis E, Silva Júnior AF,

Referência bibliográfica

- Alvarenga ER, França LR. Successful xenogenic germ cell transplantation from jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *Gen and Comp Endocrinol* 2010;230-31:48-56.
- Shin SS, Kim TM, Kim SY, Kim TW, Seo HW, Lee SK, et al. Generation of transgenic quail through germ cell-mediated germline transmission. *FASEB J* 2008;22:2435-44.
- Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:6186-91.
- Shinohara T. Germ Line Stem Cell Competition in Postnatal Mouse Testes. *Biol Reprod* 2002;66:1491-7.
- Smith LB, O'Shaughnessy PJ, Rebourcet D. Cell-specific ablation in the testis: what have we learned? *Andrology* 2015;3:1035-49.
- Soh T, Inoue Y, Xi YM, Kato Y, Hattori MA. Production of interspecific germline chimera between quail and chicken utilizing the cells from central disk of blastoderm and germinal crescent region. *J. Fac. Agr* 2004;49:69-75.
- Silveira, LF, Roda SA, Santos AMM, Soares ES, Bianchi CA. Plano de ação para a conservação do mutum-de-alagoas (*Mitu mitu* = *Pauxi mitu*). Brasília: ICMBio, Série Espécies Ameaçadas 7, p. 48, 2008a.
- Silveira, LF, Soares ES, Bianchi CA. Plano de ação para a conservação dos Galliformes ameaçados de extinção (acaruãs, jacus, jacutingas, mutuns e urus) / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília: ICMBio, Série Espécies Ameaçadas 6, p. 88, 2008b.
- Sisakhtnezhad S, Bahrami AR, Matin MM, Dehghani H, Momeni-Moghaddam M, Boozarpour S, et al. The molecular signature and spermatogenesis potential of newborn chicken spermatogonial stem cells in vitro. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 2015;51:415-25.
- Smith LB, O'Shaughnessy PJ, Rebourcet D. Cell-specific ablation in the testis: What have we learned? *Andrology* 2015;3:1035-49.
- Song Y, D'Costa S, Pardue SL, Petite JN. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion. *Mol Reprod Dev* 2005;70:438-44.
- Song Y, Silversides FG. Long-term production of donor-derived offspring from chicken ovarian transplants. *Poult Sci* 2008;87:1818-22.
- Stern CD. The chick embryo—past, present and future as a model system in developmental biology. *Mech. Dev* 2004;121: 1011-1013.
- Stern CD. The chick: a great model system become even greater. *Dev Cell* 2005;8:9-17.
- Suzuki M, Abe K, Yoshinaga K, Obinata M, Furusawa M. Specific arrest of spermatogenesis caused by apoptotic cell death in transgenic mice. *Genes Cells* 1996;1:1077-86.
- Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of component cell population. *Genes Dev* 2013;27:2409-26.
- Swift CH. Origin and early history of the primordial germ cells of the chick. *Am J Anat.* 1914;18:483-516.
- Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech. Dev* 2002;113: 29-39.
- Tagirov M, Golovan S. The effect of busulfan treatment on endogenous spermatogonial stem cells in immature roosters. *Poult Sci* 2012;91:1680-5.
- Tajima A, Hayashi H, Kamizumi A, Ogura J, Kuwana T, Chikamune T. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J. Exp. Zool* 1999;284:759-764.
- Tajima A. Conservation of Avian Genetic Resources. *J Poult Sci* 2013;50:1-8.
- Takashima S, Shinohara T. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. *Stem Cell Res* 2018;29:46-55.

Referência bibliográfica

- Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Lei Z, Rao CV, Shinohara T. The luteinizing hormone-testosterone pathway regulates mouse spermatogonial stem cell selfrenewal by suppressing WNT5A expression in Sertoli cells. *Stem Cell Rep* 2016;7:1–13.
- Tian R, Yang S, Zhu Y, Zou S, Li P, Wang J, et al. VEGF/VEGFR2 signaling regulates germ cell proliferation in vitro and promotes muse testicular regeneration in vivo. *Cells Tissues Organs* 2015;201:1-13.
- Trefil P, Polak J, Poplštejn M, Mikuš T, Kotrbová A, Rozinek J. Preparation of fowl testes as recipient organs to germ-line chimeras by means of gamma-radiation. *Br Poult Sci* 2003;44:643–50.
- Trefil P, Micáková A, Mucksová J, Hejnar J, Poplstein M, Bakst MR, et al. Restoration of Spermatogenesis and Male Fertility by Transplantation of Dispersed Testicular Cells in the Chicken. *Biol Reprod* 2006;75:575–81.
- Trefil P, Bakst MR, Yan H, Hejnar J, Kalina J, Mucksová J. Restoration of spermatogonial after trasplantation of c-Kit positive testicular cells in the fowl. *Theriogenology* 2010;74:1670-76.
- Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 2000;127:2741–2750.
- Valdez BC, Murray D, Ramdas L, de Lima M, Jones R, Kornblau S, et al. Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008;32:1684–97.
- Ventelä ST, Mäkelä J-A, Kulmala J, Westermarck J, Toppari J. Identification and Regulation of a Stage-Specific Stem Cell Niche Enriched by Nanog Positive Spermatogonial Stem Cells in the Mouse Testis. *Stem Cells* 2012;30:1008–20.
- Viguiet-Martinez MC, Hochereau-de Reviers MT, Barenton B, Perreau C. Effect of prenatal treatment with busulfan on the hypothalamo-pituitary axis, genital tract and testicular histology of prepubertal male rats. *J Reprod Fertil* 1984;70:67–73.
- Waldeyer W. Eirstock und Ei. Eine Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Sexualorgane. Leipzig: Wilhelm Engelmann; 1870.
- Wang DZ, Zhou XH, Yuan YL, Zheng XM. Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation. *Asian J Androl* 2010;12:263–70.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fert. Dev* 1995;7:871–891.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod. Sci* 2000;60:481–92.
- Wernery U, Liu C, Baskar V, Guerineche Z, Khazanehdari KA, Saleem S, Kinne J, Wernery R, Griffin DK, Chang IK. Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line Houbara Bustard offspring: potential for repopulating an endangered species. *PLoS One* 2010;5:e15824.
- Woelders H, Zuidberg CA, Hiemstra SJ. Animal genetic resources conservation in The Netherlands and Europe: Poultry perspective. *Poult. Sci* 2006;85:216–22.
- Woodcock ME, Gheyas AA, Mason AS, Nandi S, Taylor L, Sherman A, Smith J, Burt DW, Hawken R, McGrew MJ. Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *PNAS* 2019:1-8.
- Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* 2005;5:639–46.
- Yamamoto Y, Usui F, Nakamura Y, Ito Y, Tagami T, Nirasawa K, Matsubara Y, Ono T, Kagami H. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol. Reprod* 2007;77:115–119.
- Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T. A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *J. Reprod. Fertil* 1992;96:521–528.

Referência bibliográfica

- Yoshida S. Open niche regulation of mouse spermatogenic stem cells. *Develop Growth Differ* 2018;60:1-11.
- Yu F, Ding LJ, Sun GB, Sun PX, He XH, Ni LG, et al. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. *Mol Reprod Dev* 2010;77:340–7.
- YunBo, C., YiXiang, Z., GuangLi, C., Li, L., and KeJun C. Effects of busulfan on development of testis in mature rooster. *China Poult* 2009;31:26–9.
- Zaniboni L, Cassinelli C, Mangiagalli MG, Gliozzi TM, Cerolini S. Pellet cryopreservation for chicken semen: Effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during *in vitro* processing. *Theriogenology* 2014;82:251–58.
- Zhao DF, Kuwana T. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br. Poult. Sci* 2003;44:30–35.
- Zheng YH, Rengaraj D, Choi JW, Park KJ, Lee SI, et al. Expression pattern of meiosis associated SYCP family members during germline development in chickens *Reproduction* 2009; 138: 483–92.
- Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zheng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction* 2014;147:65-74.
- Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P, Nagano MC. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Hum Reprod* 2012;27:44–53.

6. ANEXOS

ANEXO A – Preparo e criosecções de embriões em estágio de epiblasto para a marcação de cNANOG segundo Nakanoh et al., 2015.

Epiblasto é um termo usado para descrever o ectoderma primitivo em amniotos (mamíferos, aves e répteis). Nas aves, inclui células na área pelúcida (equivalente ao epiblasto de mamíferos) e na área opaca (semelhante ao trofotoderma mural de mamíferos). O trofotoderma polar de mamíferos não possui um equivalente aviário. Aqui, usaremos o pintinho (*Gallus gallus*) como modelo aviário e nos preocuparemos apenas com a área pelúcida do epiblasto. Deve-se ter em mente que, além das três camadas germinativas do embrião, o epiblasto em ambos os mamíferos e as aves contribuem para o mesoderma extra-embriônico na sua totalidade e para o ectoderma extra-embriônico parcialmente. O primeiro dia de desenvolvimento do frango ocorre intrauteramente. Um ovo de galinha fertilizado recém oviposto contém aproximadamente 40.000 células atingindo o estágio X segundo Eyal-Giladi e Kochav (EGK) (Eyal-Gilardi e Kochan, 1976). O desenvolvimento intrauterino (EGK I-X) e pós-postura assim como o desenvolvimento pré-sequências (EGK XI-XIV) seguiu tradicionalmente os critérios EGK (Eyal-Gilardi e Kochav, 1976) e, correspondem coletivamente a Fase 1 do sistema Hamburger e Hamilton (HH) (Hamburger e Hamilton, 1992). Após o surgimento da linha primitiva no HH2 (cerca de 6 a 8 h de pós-incubação), o desenvolvimento da galinha é realizado de acordo com os critérios de HH (Hamburger e Hamilton, 1992). Embora a segunda metade do período intrauterino de desenvolvimento é relevante para questões relacionadas à formação de epiblastos e pluripotência, limitações técnicas na obtenção desses embriões impedem seu uso rotineiro em laboratórios sem acesso a grandes plantéis de aves. Assim, devido as nossas exigências, apresentamos principalmente sobre como manusear embriões durante as primeiras 18 h do seu desenvolvimento pós-postura

estágio EGK-X até o estágio HH5). Este período de desenvolvimento da galinha corresponde aproximadamente a E5.5-E7.5 do desenvolvimento em camundongo.

1. Preparo das soluções:

a. Solução salina de Pannet-Compton:

Solução A (para 1 L de H₂O Milli-Q)

- 121 g NaCl
- 15,5 g KCl
- 10,42 g CaCl₂. 2H₂O
- 12,7 g MgCl₂.6H₂O

Solução B (para 1 L de H₂O Milli-Q)

- 1,886 g Na₂PO₄ anidro
- 0,144 g NaH₂PO₄ anidro

Após completa homogeneização, levar as soluções à autoclave.

Para o preparo de 1 L da Solução salina de Pannet-Compton, mistura nesta ordem:

40 mL da **Solução A**, 900 mL de H₂O Milli-Q e 60 mL da **Solução B**.

b. Solução tampão-fosfato salino (PBS).

Para o preparo de 1 L da solução:

- 8g NaCl (137 mM)
- 0,2 g KCl (2,7 mM)
- 1,44 g Na₂HPO₄ (10 mM)
- 0,24 g KH₂PO₄ (1,8 mM)

Após a pesagem, dissolver os reagentes listados acima em 800 mL de H₂O Milli-Q.

Ajustar o pH para 7,4 com HCl e, então adicionar o restante de H₂O para completar 1

L. Em seguida, despeje a solução em alíquotas e esterilize-a utilizando um filtro (70 μm) ou autoclave por 20 min, 15 psi (1,05 kg/cm²).

c. Paraformaldeído 4% (PFA 4%):

Para o preparo de 100 mL da solução:

Trabalhando em uma capela de exaustão, adicione 4 g de paraformaldeído em pó em 90 mL de PBS pré-aquecido (65° C) e mantenha-o sob agitação contínua.

Após a completa dissolução, ajustar o pH a 7,5 com NaOH e, arrefecer até a temperatura ambiente. Em seguida, adicione EGTA (2 μM) e transfira-o para a geladeira em tubo falcon (50 mL) protegido da luz.

d. PBS 20% de sacarose:

Para o preparo de 100 mL da solução, pesar 20 g de sacarose e, diluir em 100 mL de PBS 1x.

2. Coleta do embrião:

a. Ovos embrionados recém ovipostos são virados de cabeça pra baixo e incubados por 2 horas (38° C).

Desta forma a gema é posicionada mais abaixo dentro do ovo.

b. Em seguida, é feita uma incisão com auxílio de uma pinça no ovo (câmara de ar) removendo toda parte superior. Subsequentemente, boa parte do albúmen é removido e com auxílio de uma tesoura faça 3-4 corte ao redor do embrião.

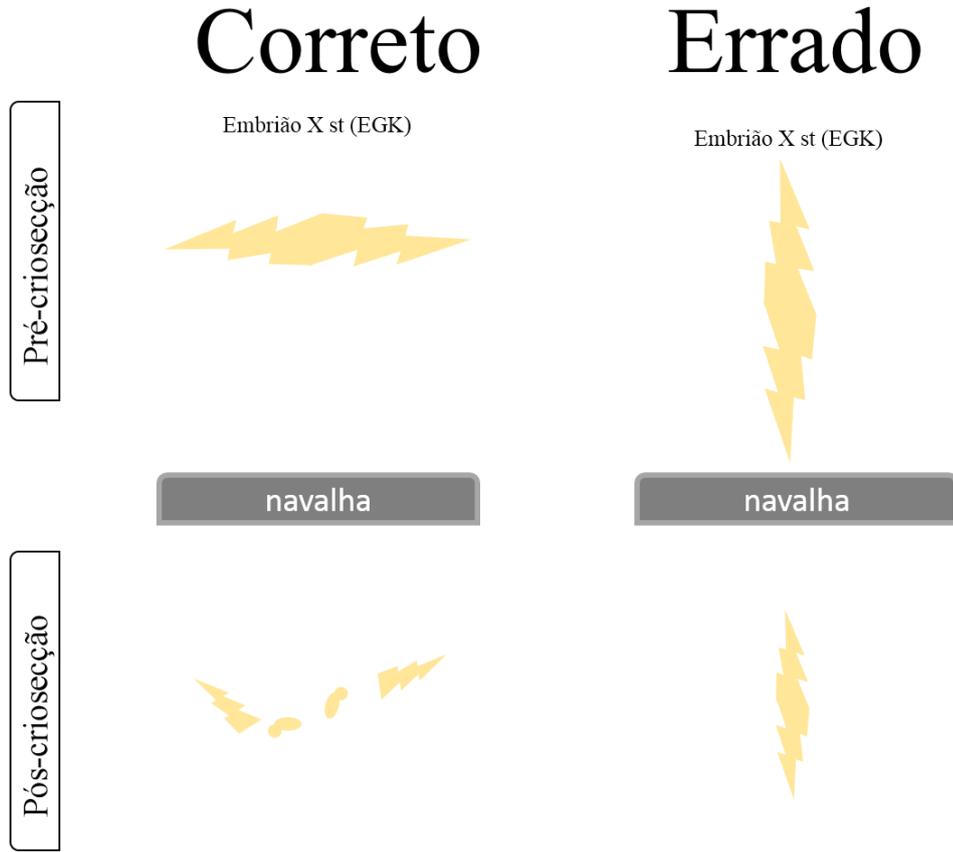
c. Recolha o embrião, juntamente com a membrana vitelínica acima e gema abaixo, com uma colher. Mergulhe o embrião em Solução de Pannet-compton.

d. Com uma pinça fina, remova a gema da membrana vitelínica. Na maioria dos casos, após 1 hora de incubação em solução de Pannet-compton a gema se desprenderá da membrana. Caso contrário, utilize uma pipeta Pauster para

enxaguar o embrião repetindo movimentos de aspirar e expirá-lo sob a coluna de solução. Dessa forma, a membrana vitelínica também se desprendera e, assim o embrião poderá ser fixado.

- e. Após completa lavagem, o embrião é fixado em PFA 4% gelado durante a noite em geladeira (5° C).
- f. Após a fixação, lavar o embrião em PBS 1x e preparar o tecido para o congelamento através da incorporação de sacarose (a sacarose evita que o tecido fique quebradiço). Para tal, incubar o embrião em solução PBS contendo 20% de sacarose por um período de 3 horas ou, até o embrião afundar completamente no tubo.
 - I. Certifique-se do posicionamento correto dos embriões no momento do preparo dos blocos, isso será importante durante o corte (Figura 18)
- g. Após a incorporação da sacarose, lavar o embrião 1x em PBS e inclui-lo em O.C.T. Após a inclusão e posicionamento do tecido em bloquinhos, congela-lo sob vapor de nitrogênio líquido ou em gelo seco.
 - I. Certifique-se do posicionamento correto dos embriões no momento do preparo dos blocos, isso será importante durante o corte (Figura 18)
- h. Utilizando um criostato, faça criosecções de 10-20 μm de espessura (caso tenha um microscópio confocal, criosecções mais espessas (40 – 50 μm podem ser feitas).
 - I. Para preservar a estrutura do embrião, certifique-se da direção da navalha durante os cortes.

Figura 23 – Representação esquemática do posicionamento correto do embrião durante a criosecção.



Fonte: Blank (2020)

ANEXO B – Protocolo de extração de RNA (TRIzol®)

Atenção, execute todas as etapas em temperatura ambiente (20–25 ° C). Use o reagente TRIzol™ gelado se o material de partida contiver altos níveis de RNase, como amostras de baço ou pâncreas. Use artigos de plástico estéreis descartáveis, embalados individualmente e pontas e tubos estéreis e descartáveis, livres de RNase. Use luvas descartáveis ao manusear os reagentes e amostras de RNA para evitar a contaminação por RNase da superfície da pele; troque de luvas com frequência, principalmente porque o protocolo progride de extratos brutos para materiais mais purificados. Sempre use técnicas assépticas microbiológicas adequadas quando trabalhando com RNA. Use a solução de descontaminação RNaseZap™ RNase (ref. nº. AM9780) para remover a contaminação por RNase das superfícies de trabalho e itens não descartáveis, como centrífugas e itens utilizados usadas durante o protocolo.

Realizar a extração e isolamento de RNA imediatamente após a coleta das amostras ou, amostras estocadas em nitrogênio líquido (–196° C) ou freezer (–80° C) imediatamente após a coleta.

1. Protocolo de digestão e lise para tecido (testículo).

- a. Adicionar 1 mL do reagente TRIzol™ por 50 – 100 mg de tecido (pulverizado) e, homogeneíze utilizando um vortex. (As amostras não devem exceder 10% do volume de TRIzol utilizado).
 - I. Amostras podem ser estocadas a 4° C durante a noite ou a –20° C por até 1 ano
- b. (*Opcional*). Se as amostras tiverem um alto teor de gordura, centrifugue o lisado por 5 minutos a 12.000 x g a 4-10° C, depois transfira o sobrenadante para um novo tubo.

- c. Incube por 5 minutos para permitir a dissociação completa do complexo de nucleoproteínas.
- d. Adicione 0,2 mL de clorofórmio a cada 1 mL de TRIzol™ usado durante a etapa de lise (**etapa a**) e tampe o tubo cuidadosamente.
- e. Incube por 2 a 3 minutos.
- f. Centrifugue a amostra por 15 minutos a 12.000 x g a 4° C. A mistura se separa em um fenol-clorofórmio vermelho inferior (camada orgânica), e interfase (DNA), e uma fase superior aquosa incolor (RNA).
- g. Transfira a fração aquosa e incolor que contém o RNA para um novo tubo.
- h. Novamente, transfira a fase aquosa que contém o RNA para um novo tubo pipetando a solução mantendo o tubo inclinando a 45°.
 - I. **IMPORTANTE!** Evite transferir qualquer parte da interfase (DNA) ou camada orgânica (proteína) durante a remoção da fase aquosa.

2. Protocolo para isolamento do RNA.

- a. (*Opcional*) Se a amostra inicial for pequena (<10⁶ células ou <10 mg de tecido), adicione 5 a 10 µg de glicogênio como transportador para a fase aquosa.
 - I. O glicogênio é co-precipitado com o RNA, mas não interfere nas reações subsequentes.
- b. Adicionar 0,5 mL de isopropanol à fase aquosa, a cada 1 mL de TRIzol™ (**etapa a**).
- c. Incubar por 10 minutos.
- d. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 x g a 4° C.
 - I. O precipitado total de RNA forma uma pastilha branca semelhante a um gel no fundo do tubo.
- e. Descarte o sobrenadante com uma micropipeta.

- f. Ressuspender o sedimento em 1 mL de etanol 75% a cada 1 mL de TRIzol™
(**etapa a**).
 - I. O RNA pode ser armazenado em etanol 75% por pelo menos 1 ano a –20° C ou pelo menos 1 semana a 4° C (geladeira).
- g. Agite brevemente a amostra no vortex e depois centrifugue por 5 minutos a 7500 x g a 4° C.
- h. Descarte o sobrenadante com uma micropipeta.
- i. Secar o sedimento de RNA a vácuo ou ar seco por 5 a 10 minutos.
 - I. **IMPORTANTE!** Não seque o sedimento por centrifugação a vácuo. Não deixe o pellet de RNA secar, para garantir total solubilização do RNA. Amostras de RNA parcialmente dissolvidas têm uma proporção A230 / 280 <1,6.
- j. Ressuspender o sedimento em 20-50 µL de água livre de RNase, EDTA 0,1 mM ou solução SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 0,5 % através de repetidas pipetagens para cima e para baixo.
 - I. **IMPORANTE!** Não dissolva o RNA em SDS se o RNA for utilizado em reações enzimáticas subsequentes.
- k. Incubar em banho-maria ou bloco térmico a 55-60° C por 10-15 minutos.
- l. Prossiga para a quantificação, aplicação em ensaios moleculares e/ou armazenamento a -80° C para posterior utilização.

ANEXO C – Transcriptase reversa do RNA testicular para obtenção de cDNA segundo protocolo SuperScript® III (Invitrogen, EUA).

A Transcriptase Reversa SuperScript™ III é uma versão projetada do M-MLV RT com atividade reduzida da RNase H e aumento da estabilidade térmica. A enzima é purificada até quase homogeneidade a partir de *E. coli* contendo o gene *pol* modificado do vírus da leucemia murina Moloney. A enzima pode ser usada para sintetizar o cDNA da primeira fita a temperaturas de até 55° C, fornecendo especificidade aumentada, rendimentos mais altos de cDNA e mais produtos completos do que outras transcrições reversas. Pode gerar cDNA de 100 pb a > 12 kb.

1. Síntese de cDNA:

- I. O Seguinte volume de reação (20 µL) pode ser usado para 10 pg – 5 µg de RNA total ou 10 pg – 500 ng de mRNA.
 - a. Adicione os seguintes componentes a um tubo de microcentrífuga sem nuclease:
 - I. 1 µL do oligo (dT)₂₀ (50 µM); ou 200-500 ng de oligo (dT)₁₂₋₁₈; ou 50-250 ng iniciadores aleatórios; ou 2 pmol do primer iniciador específico do gene.
 - II. 10 pg – 5 µg total de RNA ou 10 pg-500 ng mRNA
 - III. 1 µL dNTP Mix (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP em pH neutro.
 - IV. Otimizar a reação com água destilada estéril até 13 µL.
 - b. Aqueça a mistura a 65° C por 5 minutos e incube no gelo por pelo menos 1 minuto.
 - c. Recolha o conteúdo do tubo por centrifugação breve e adicione:
 - I. 4 µL de tampão de primeira fita 5X (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 a temperatura ambiente), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

- II. 1 μ L de DTT 0,1 M
- III. 1 μ L de inibidor de RNase recombinante RNaseOUT™ (Cat. No. 10777-019, 40 units/ μ L).

Nota: Ao usar menos de 50 ng de RNA inicial, a adição de RNaseOUT™ é essencial.

- IV. 1 μ L de SuperScript™ III RT (200 unidades / μ L) *

*Se gerar cDNA maior que 5 kb em temperatura acima de 50° C usando um iniciador específico do gene ou oligo (dT) 20, a quantidade de SuperScript™ III RT pode ser aumentada para 400 U (2 μ L) para aumentar o rendimento.

- d. Misture pipetando suavemente para cima e para baixo. Se estiver usando primers aleatórios, incubar o tubo em 25° C por minutos.
- e. Incubar a 50° C por 30-60 minutos.
- f. Desative a reação aquecendo a 70° C por 15 minutos. O cDNA agora pode ser usado como modelo para amplificação em PCR. Contudo, a amplificação de alguns alvos de PCR (aqueles >1 kb) pode exigir a remoção de RNA completar ao cDNA. Para remover o RNA completar ao cDNA, adicione 1 μ L (2 unidades) de *E. coli* RNase H e incube a 37° C por 20 minutos.

ANEXO D – Protocolo para a detecção do anticorpo monoclonal QCPN por meio de Imunohistoquímica do tecido testicular.

O marcador de células de codorna (QCPN) é um anticorpo monoclonal que reconhece a membrana perinuclear e nuclear de células de codorna e, portanto, foi utilizado para distinguir células de galo e codorna. O sobrenadante da cultura QCPN foi obtido do Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) sob identificação AB_531886. Para ensaios imunohistoquímicos recomenda-se uma concentração de 2-5 µg/ml do anticorpo. Segue abaixo o protocolo otimizado para secções testiculares.

1. Procedimento de coloração em lamina:

a. Desparafinização:

I. Xilol - 5 minutos (3 vezes)

II. Álcool Etílico 100% - 5 minutos (2 vezes)

III. Álcool Etílico 95% - 1 minuto (1 vez)

IV. Álcool Etílico 80% - 1 minuto (1 vez)

V. Álcool Etílico 70% - 1 minuto (1 vez)

b. Enxaguar em solução 0,1% de BSA (Albumina Sérica Bovina, Sigma) em 50 mL de PBS (50 mg BSA; 50 mL de PBS) – 2 minutos (2 vezes)

c. Permeabilizar em solução detergente 0,5% (5 mL de Triton – X (Sigma); 995 mL de PBS) – 5 minutos (2 vezes)

d. Recuperação antigênica:

I. Aquecer laminas em micro-ondas por 10 minutos submersas em solução tampão TRIS-EDTA (Tris (hidroximetil) aminometano 10 mM; ácido (etilenodinitrilo) tetraacético 1mM) com 0,05% de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno sorbitano).

Posteriormente, aguardar o tampão esfriar por 30 minutos a temperatura ambiente antes de retirar as laminas.

- e. Enxaguar as laminas em solução 0,5 % Triton – 5 minutos (2 vezes)
- f. Secar laminas com cuidado utilizando papel toalha.
- g. Induzir o bloqueio da peroxidase endógena com Hydrogen Peroxide Block a temperatura ambiente em câmara úmida por 15 minutos.

ATENÇÃO! Cobrir completamente o corte histológico.

- h. Em seguida, permeabilizar a secção em solução 0,5% Triton – 5 minutos (2 vezes)
- i. Bloquear reações inespecíficas com Protein Block por 10 minutos.
- j. Despejar a solução (etapa i) e, circundar a secção com caneta hidrofóbica (PAP pen, Sigma).
- k. Incubar o anticorpo primário (2-5 µg /mL em solução 0,5% triton X) durante a noite em câmara úmida.

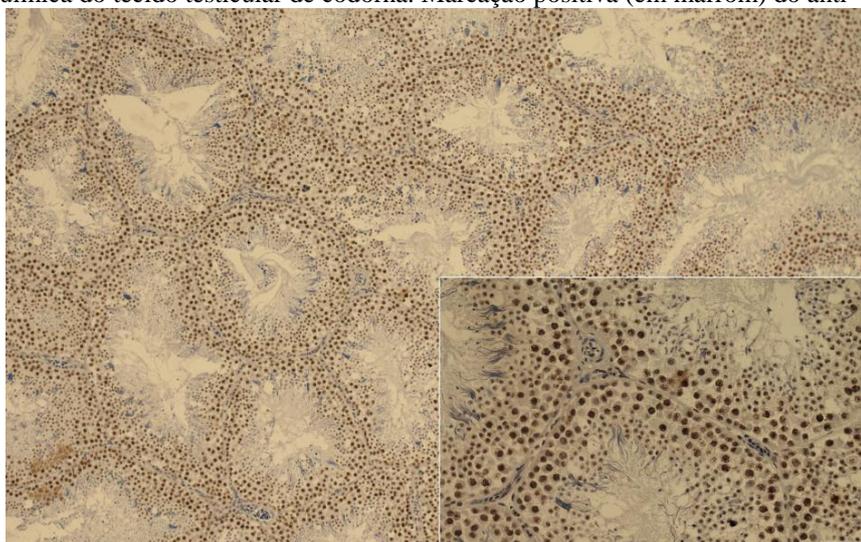
ATENÇÃO! Revestir toda a secção com o anticorpo.

- l. Após período de incubação, enxaguar as laminas em solução 0,5% Triton X – 5 minutos (2 vezes)
 - m. Secar as laminas com papel toalha e, incubar substrato horseradish peroxidase (HRP) por 30 minutos.
 - n. Escorrer e secar as laminas e, incubar conjugado HRP por 1 hora (polímero com reatividade para coelho e camundongo)
 - o. Lavar as laminas com solução 0,5% Triton X – 5 minutos (1 vez)
 - p. Incubar com solução DAB (3,3'-Diaminobenzidina) 1 µL /mL por 45 segundos
- ATENÇÃO! Revestir toda secção com DAB

- q. Imediatamente, enxaguar gentilmente com água destilada – 5 minutos (1 vez)

- r. Corar com solução hematoxilina de Harris (Sigma) por 5 minutos
- s. Lavar em água corrente por 5 minutos
- t. Secar as laminas e fixar
- u. Fixar
 - I. Álcool 70% - 1 minuto (1 vez)
 - II. Álcool 80% - 1 minuto (1 vez)
 - III. Álcool 95% - 1 minuto (1 vez)
 - IV. Álcool 100% - 5 minutos (2 vezes)
 - V. Xilol – 5 minutos (3 vezes)
- v. Secar em temperatura ambiente e, fechar com meio de montagem Permount e lamínula.

Figura 24 – Imunohistoquímica do tecido testicular de codorna. Marcação positiva (em marrom) do anti-QCPN



Fonte: Blank (2020)

ANEXO E – Protocolo de extração de DNA (DNeasy® Blood & Tissue kit
QIAGEN®)

Os kits de sangue e tecidos DNeasy foram projetados para purificação rápida do DNA total (por exemplo, genômica, mitocondrial e patógena) de várias fontes de amostras, incluindo tecidos e células de animais frescos ou congelados, sangue ou bactérias. O DNA purificado é livre de contaminantes e inibidores de enzimas e é altamente adequado para PCR e, aplicações de Southern blotting, RAPD, AFLP e RFLP. O DNA purificado é eluído em tampão com baixo teor de sal ou água, pronto para uso em jusante aplicações. O DNA purificado DNeasy normalmente tem uma proporção A260 / A280 entre 1,7 e 1,9 e tem tamanho de até 50 kb, com fragmentos de 30 kb predominando. The DNeasy O procedimento também recupera eficientemente fragmentos de DNA de até 100 pb.

1. NOTAS:

- a. Realizar todos os procedimentos de centrifugação em temperatura ambiente (15 – 25° C)
- b. Se necessário, redissolva quaisquer precipitados nos tampões ATL e AL
- c. Antes de iniciar o protocolo, adicione etanol (Álcool etílico 96 – 100%) aos tampões AW1 e AW2 seguindo as recomendações do fabricante na embalagem
- d. Pré-aqueça um termonisturador, banho de água com agitação ou placa aquecedora a 56° C
- e. Se estiver utilizando tecido congelado, equilibre a amostra em temperatura ambiente.

2. Extração de gDNA a partir de tecido testicular:

- a. Corte o tecido (até 25 mg) em pedaços pequenos e coloque em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- b. Adicione 180 µL do tampão de lise ATL e, 20 µL de Proteinase K.
- c. Misture em vortex vigorosamente e incube a reação a 56° C até completar a lise.
 - I. Ocasionalmente, agite a reação no vortex.

A lise geralmente é concluída entre 1 a 3 horas.

- d. Se for necessário gDNA livre de RNA, a RNase A deve ser adicionada à amostra antes da adição do tampão AL, para digerir o RNA. Assim, 4 μL de RNase A (100 mg/ μL) foi adicionado a reação misturado em vortex e incubado por 2 min a 37° C.
- e. Em seguida, foi adicionado a reação 200 μL do tampão AL e misturada vigorosamente em vortex.
- f. Após a mistura, foi adicionado 200 μL de etanol (96 – 100%) e novamente misturado vigorosamente em vortex.
- g. Imediatamente, a reação foi transferida para uma coluna de DNasy mini spin (2 mL) com auxílio de uma pipeta. Então, a coluna foi centrifugada a 6000 x g por 1 minuto.
- h. Descarte o líquido que ultrapassou a coluna e, transfira a coluna para um novo tubo de coleta (2 mL).
- i. Adicione 500 μL do tampão AW1 sob a coluna. Centrifugue por 1 minuto a 6000 x g.
- j. Repita o procedimento da etapa h
- k. Adicione 500 μL do tampão AW2 sob a coluna. Centrifugue por 3 minutos a 20000 x g.
- l. Descarte o líquido que ultrapassou a coluna removendo cuidadosamente a coluna para que não entre em contato com o líquido.
- m. Transfira a coluna para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL ou 2 mL e adicione 100 μL do tampão de eluição AE. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente e, centrifugue por 1 minuto a 6000 x g.
 - I. ATENÇÃO! Repita esta etapa para obter o rendimento máximo (máximo 3 vezes).
- n. Prossiga para a quantificação, aplicação em ensaios moleculares e/ou armazenamento a -20° C para posterior utilização.

ANEXO F – Protocolo de coloração de células testiculares utilizando PKH26
Red (Sigma)

O marcador fluorescente PKH26 utiliza uma propriedade de coloração da membrana celular. Devido sua extrema lipofilicidade em condições iso-osmóticas sem sal, a coloração se baseia na incorporação de um corante estável amarelo-laranja, onde seu longo grupo de hidrocarbonetos alifáticos se agregam as regiões de bicamada lipídica da membrana celular através de fortes interações não-covalentes.

O veículo de marcação fornecido nos kits (Diluyente C) é uma solução aquosa projetada para manter a viabilidade celular, maximizando a solubilidade do corante e a eficiência da coloração durante a etapa de coloração. O diluyente C é iso-osmótico par células de mamíferos e não contém detergentes ou solventes orgânicos, mas também carece de sais e tampões.

Devido à sua fluorescência extremamente estável, o PKH26 é o corante celular ligante de escolha para estudos de rastreamento celular *in vivo*, principalmente quando as células marcadas devem ser rastreadas por períodos superiores a algumas semanas.

NOTA: Realizar todas as etapas em temperatura ambiente (20 – 25° C) e protegido da luz.

1. Procedimento de coloração

- a. Transfira um total de 20×10^6 células em um tubo falcon (15 mL)
- b. Centrifugue as células em 400 x g por 5 min e lave uma vez utilizando meio (DMEM) sem soro
- c. Centrifugue novamente a suspensão de células a 400 x g por 5 min
- d. Aguardando a centrifugação, prepare a **solução de coloração** (18 μ M) utilizando o diluidor C. Portanto, adicione 18 μ L de PKH26 etanólico em 1 mL de diluidor C em um tubo eppendorf (**protegido da luz**).

- e. Após a centrifugação, remover todo sobrenadante (DMEM) evitando deixar mais que 25 μ L de sobrenadante
- f. Adicione 1 mL do diluidor C ao sedimento e, ressuspensa as células suavemente utilizando uma pipeta (**Solução de suspensão**)
- g. Imediatamente após desfazer por completo o sedimento, adicione 1 mL da **solução de coloração** (etapa d) à **solução de suspensão** e misture as soluções por pipetagem (**protegido da luz**).
- h. Após completar a mistura, incubar a solução com concentração final de 10×10^6 células 9μ M/mL por 2-5 min com agitação periódica (**protegido da luz**).
- i. Após a incubação, interromper a coloração adicionando um volume igual (2 mL) de Soro Fetal Bovino FBS e, incubar por 1 min (**protegido da luz**).
- j. Em seguida, centrifugue as células a $400 \times g$ por 10 min e, remova cuidadosamente a solução de bloqueio (**protegido da luz**).
- k. Ressuspender o sedimento em 2 mL de DMEM sem soro e transfira a suspensão para um tubo falcon 15 mL estéril, repetir a lavagem mais duas vezes
- l. Após a última lavagem, ressuspender as células em 1 mL de DMEM e realizar a contagem sob uma câmara de Neubauer
- m. Ajustar a concentração para o transplante.

Obs: Concentração final para o transplante foi de $0,2 \times 10^6$ células viáveis em 50 μ L por testículo.

Apêndices

APÊNDICES



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61629-2	Data da Emissão: 08/02/2018 10:27	Data para Revalidação*: 10/03/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RICARDO JOSÉ GARCIA PEREIRA	CPF: 270.360.718-00
Título do Projeto: CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CRACÍDEOS AMEAÇADOS POR MEIO DE TRANSPLANTES INTERESPECÍFICOS DE CÉLULAS GERMINATIVAS	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material biológico	01/2018	08/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CONTAGEM	MG	Crax Brasil ? Sociedade de Pesquisa da Fauna Silvestre	Fora de UC Federal
2	SOROCABA	SP	Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros	Fora de UC Federal
3	FOZ DO IGUAÇU	PR	Parque das Aves	Fora de UC Federal
4	POCOS DE CALDAS	MG	Criadouro poços de caldas	Fora de UC Federal
5	BORA	SP	Instituto Pauxi Mitu	Fora de UC Federal
6	ITATIBA	SP	Zooparque Itatiba	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cracidae

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 12437984





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61629-2	Data da Emissão: 08/02/2018 10:27	Data para Revalidação*: 10/03/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RICARDO JOSÉ GARCIA PEREIRA	CPF: 270.360.718-00
Título do Projeto: CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CRACÍDEOS AMEAÇADOS POR MEIO DE TRANSPLANTES INTERESPECÍFICOS DE CÉLULAS GERMINATIVAS	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(Biopsia testicular de animais que vierem a A*bito)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 12437984



Página 2/4

Apêndices



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61629-2	Data da Emissão: 08/02/2018 10:27	Data para Revalidação*: 10/03/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RICARDO JOSÉ GARCIA PEREIRA	CPF: 270.360.718-00
Título do Projeto: CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE CRACÍDEOS AMEAÇADOS POR MEIO DE TRANSPLANTES INTERESPECÍFICOS DE CÉLULAS GERMINATIVAS	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 12437984



Página 4/4