



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)

São Paulo State University-Aquaculture Center



Androgênese em *Astyanax altiparanae*:
Ferramenta de Reconstituição em Peixes

Matheus Pereira dos Santos

Orientadora: Profa. Dr^a. Laura Satiko Okada Nakaghi

Co - Orientador: Dr. George Shigueki Yasui

JABOTICABAL - SP
2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)

São Paulo State University-Aquaculture Center



Androgênese em *Astyanax altiparanae*: **Ferramenta de Reconstituição em Peixes**

Matheus Pereira dos Santos

Orientadora: Profa. Dr^a. Laura Satiko Okada Nakaghi

Coorientador: Dr. George Shigueki Yasui

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biologia de Organismos Aquáticos e Aquicultura

JABOTICABAL – SP
2017

Santos, Matheus Pereira dos

S237a Androgênese em *Astyanax altiparanae*: Ferramenta de Reconstituição em Peixes / Matheus Pereira dos Santos. -- Jaboticabal, 2017

xix, 175 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2017

Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi

Banca examinadora: Fausto Foresti, Sérgio Ricardo Batlouni, Sérgio Fonseca Zaiden, Sílvio Roberto Consonni

Bibliografia

1. Manipulação cromossômica. 2. Embriologia. 3. Peixes. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

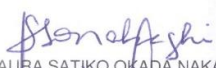
Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Androgênese em *Astyanax altiparanae*: Ferramenta de Reconstituição em Peixes.

AUTOR: MATHEUS PEREIRA DOS SANTOS
ORIENTADORA: LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
COORIENTADOR: GEORGE SHIGUEKI YASUI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. FAUSTO FORESTI
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu


Prof. Dr. SÉRGIO RICARDO BATLOUNI
Laboratório de Reprodução de Peixes / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP


Prof. Dr. SÉRGIO FONSECA ZAIDEN
FUNDAÇÃO DE ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE


Prof. Dr. SILVIO ROBERTO CONSONNI
Departamento de Histologia e Embriologia / Universidade Estadual de Campinas

Jaboticabal, 25 de abril de 2017

“[...] O que tiver de ser, será... e ele teria que enfrentar o que fosse quando viesse.”

J. K. Rowling – Harry Potter e o Cálice de Fogo

Agradecimentos

Pessoas que fizeram parte da minha trajetória

À minha família, por sempre acreditar, apoiar e sonhar com o meu trabalho.
Minha eterna gratidão e amor!

À professora Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, por tudo: os momentos vividos, a história de orientação e aprendizado, por sua presença sempre constante em todos os momentos, felizes e difíceis, minha eterna gratidão, respeito e admiração!

Ao meu amigo Paulo André de Andrade Santos, sempre presente na minha trajetória, pela amizade e todos os momentos que vivemos juntos.

À amiga Juliana Fernandes, por tudo que já vivemos juntos e ainda viveremos.

À amiga Francine Faustino Theodoro Costa, que acompanhou toda minha trajetória na pós graduação, sendo, desde o início, uma pessoa muito especial pra mim e uma companheira em todos os momentos.

Ao doutor José Augusto Senhorini, pela amizade, conselhos, orientações e toda ajuda durante minha estadia no CEPTA, em Pirassununga.

Ao doutor George Shigueki Yasui, por todas as orientações e questionamentos que levaram ao desenvolvimento e aprimoramento deste trabalho.

À professora Suzana Guimarães Morais, responsável pela disciplina Biologia Celular e Histologia na Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), pelos ensinamentos

em docência, pela orientação e por ter me recebido tão bem durante a realização do meu segundo estágio em docência.

Às professoras Lia Rossi e Taize Machado Augusto, da Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), pelas orientações, companheirismo e amizade durante a realização do meu estágio em docência.

Ao Roberto Alexandre Povolo Segura, técnico de Histologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), pela parceria e amizade que fizemos durante a minha estadia na faculdade.

À Turma 48 do curso de Medicina da FMJ, em Jundiaí. 120 alunos queridos que tive a honra de conhecer e lecionar, e dos quais sempre me lembrarei com carinho e orgulho.

À Turma 014 do curso de Ciências Biológicas da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, primeira turma de alunos com quem tive experiência de docência durante meu primeiro estágio da pós graduação. Muito obrigado pelo carinho e por terem me recebido tão bem.

Ao amigo Diógenes Henrique Siqueira Silva, que acompanhou toda a minha trajetória acadêmica até então, me ajudando, orientando e muitas vezes servindo como um exemplo de profissional e pessoa.

Ao pessoal da academia Acquavida, em Pirassununga/SP, profissionais e amigos queridos que tive o prazer de encontrar durante essa trajetória, tornando os meus dias e a minha rotina mais leves e saudáveis. Em especial, a professora Tayane Chiamente e ao amigo Vinícius Vieira Borges Maciel.

Aos meus grandes amigos Márcio Alves e Lílian Cristina Makino, companheiros queridos que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando, aconselhando e participando da minha história, muitas vezes mesmo a distância.

Aos amigos Nivaldo Ferreira do Nascimento e Francine Faustino Theodoro Costa, pela presença constante, pela parceria sempre presente e por toda a amizade.

Aos grandes e queridos amigos de laboratório em Jaboticabal, Fernanda Nogueira Valentin, Cleonice Cristina Hilbig, Breno Manzini, Regiane Cristina da Silva, Maria do Carmo Faria Paes, Letícia Higuchi e Marcelo Assunção, por todos os momentos de amizade, histórias e companheirismo que compartilhamos.

Aos amigos de Pirassununga, Rafaela Manchin Bertolini, Matheus Tonetti Galeni, Nycolas Levy Pereira, Dilberto Ribeiro, Natalia Greice Matheus, Bárbara Carolina, Talita Lázaro, Bruna Machado, Gustavo Levy, Lucas Henrique Piva, Adriana Bordignon, Camila Fernandes, Mariana Marques, Lúcia Suarez Lopez, Leonardo Calado, Nilva Solange e Claudine Martins.

À amiga Mariana Machado Evangelista, pela companhia nos momentos de coleta, pela presença sempre constante me ajudando, aconselhando e participando do trabalho.

À amiga Tabatha Fernanda Lopes, sempre presente de alguma forma desde o colegial.

Aos amigos Nadya Soares de Macedo Adamov, Tamiris Disseli, Willian Oliveira e Isabela Malachias Gaspar, pelos momentos de convivência em Pirassununga, pela dedicação e preocupação com o meu trabalho e por toda amizade que cultivamos.

Aos amigos Pedro Luiz Porfírio Xavier, Isaac Yo e Victor Costa Spandri, pela parceria e por toda ajuda que dedicaram ao meu trabalho.

Às amigas queridas de Pirassununga Elayna Cristina Maciel e Isabella Rocha Menezes, pela parceria, pelas histórias compartilhadas e por toda ajuda e amparo durante minha trajetória.

Aos amigos de Ilha Solteira, Letícia Guerra Aldrigui, Raphael da Silva Costa, Cristiane Bashiyo e Geovanna Coelho pelos momentos compartilhados, pela amizade e boas lembranças.

Ao meu orientador de graduação Dr. Alexandre Ninhaus Silveira, por ter me dado a primeira oportunidade na pesquisa, pelos seus ensinamentos, paciência e sabedoria.

Equipes e Instituições

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), pelo amparo e suporte em conhecimento durante todo o meu amadurecimento profissional.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Jaboticabal/SP, por todo suporte técnico durante minha trajetória na pós graduação.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal/SP.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal/SP, pelo apoio e orientação durante minha formação como mestre e doutor.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICBio), em Pirassununga/SP, pela parceria realizada ao longo de toda a minha formação, indo muito além apenas do fornecimento de material biológico, mas participando ativamente do meu progresso e formação.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pela recepção e estrutura técnicas necessárias para o desenvolvimento de análises deste projeto, especialmente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRP/USP

A Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ) por todo conhecimento e apoio com que fui agraciado durante a realização do meu estágio de docência.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), em Pirassununga/SP, pelo fornecimento de estrutura e pela recepção com que sempre fui recebido.

A Biblioteca Municipal Chico Mestre de Pirassununga, pelos amigos que fiz durante o período em que estive na cidade e pelos prazerosos momentos de leitura.

“Por alguma razão, não conseguia encontrar palavras para dizer o que significava para ele vê-los ali enfileirados, ao seu lado. Em lugar de falar, sorriu, ergueu a mão num gesto de despedida, virou-se e saiu da estação para a rua ensolarada [...]”

J.K. Rowling – Harry Potter e a Ordem da Fênix

Sumário

Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	16
Resumo Geral.....	20
General Abstract.....	22
Introdução Geral.....	24
Referências Bibliográficas.....	35
Capítulo I.....	44
Sumário.....	45
<i>Resumo.....</i>	<i>46</i>
<i>Introdução.....</i>	<i>47</i>
<i>Material e Métodos.....</i>	<i>48</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>54</i>
<i>Discussão.....</i>	<i>64</i>
<i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>67</i>
<i>Agradecimentos.....</i>	<i>74</i>
Capítulo II.....	75
Sumário.....	76
<i>Resumo.....</i>	<i>77</i>
<i>Introdução.....</i>	<i>78</i>
<i>Material e Métodos.....</i>	<i>80</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>88</i>
<i>Discussão.....</i>	<i>103</i>
<i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>106</i>
<i>Agradecimentos.....</i>	<i>110</i>
Capítulo III.....	111

Sumário	112
<i>Resumo</i>	113
<i>Introdução</i>	114
<i>Material e Métodos</i>	117
<i>Resultados</i>	122
<i>Discussão</i>	134
<i>Referências Bibliográficas</i>	136
<i>Agradecimentos</i>	140
Capítulo IV	141
Sumário	142
<i>Resumo</i>	143
<i>Introdução</i>	144
<i>Material e Métodos</i>	146
<i>Resultados</i>	152
<i>Discussão</i>	162
<i>Referências Bibliográficas</i>	165
<i>Agradecimentos</i>	167
Considerações Finais	168
Anexo	171

Lista de Figuras**Capítulo I**

Figura 1: Metodologia de fertilização e análise do desenvolvimento embrionário.....**51**

Figura 2: Oócitos de *Astyanax altiparanae* estocados por 60 minutos (A), 120 minutos (B), 180 minutos (C) e 240 minutos (D) pós extrusão. Asteriscos indicam oócitos com hidratação parcial ou total durante a estocagem; setas destacam alterações morfológicas na estrutura dos oócitos. Barra de escala: 100 μm**60**

Figura 3: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae*. Oócitos fertilizados imediatamente após a extrusão (controle) nos estágios de blástula, gástrula e segmentação (A, B, C). Embriões cujos oócitos foram fertilizados 60 minutos após a extrusão (D, E, F); 120 minutos após a extrusão (G,H, I); 180 minutos após a extrusão (J, K, L) e 240 minutos após a extrusão (M, N, O). Asteriscos indicam malformações durante as divisões celulares da blastoderme, setas indicam células desprendidas dos embriões, setas brancas indicam malformações durante a gastrulação, estrelas destacam malformações na conformação do vitelo, triângulo indica malformações na região cefálica e círculos representam malformações na região caudal. Barra de escala: 100 μm**61**

Figura 4: Larvas de *Astyanax altiparanae* provenientes de oócitos fertilizados imediatamente após a extrusão (controle) (A), fertilizados após 60 minutos de estocagem (B), após 120 minutos de estocagem (C) e após 180 minutos de estocagem (D). Linha em curva indica desenvolvimento anormal da região caudal, estrela destaca curvatura anormal na cauda, linha tracejada destaca padrão anormal de diferenciação cefálica e seta destaca conformação atípica do vitelo.....62

Figura 5: Análise de ploidia destacando indivíduos diploides e triploides na espécie *Astyanax altiparanae*, por meio de citometria de fluxo (A, B) e esfregaço sanguíneo (C, D).....63

Capítulo II

Figura 1: Metodologia de estocagem e fertilização dos oócitos.....84

Figura 2: Metodologia de irradiação e fertilização dos oócitos.....86

Figura 3: Oócitos de *Astyanax altiparanae* recém fertilizados após a extrusão (A) e estocados em solução de dPBS (B), Hanks (C) e Ringer (D) por 120 minutos após a extrusão, para posterior fertilização. Barra de escala: 100 µm.....94

Figura 4: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, cujos oócitos foram fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C) e cujos oócitos foram fertilizados após 120 minutos de extrusão em três soluções: dPBS (D, E, F), Hanks (G, H, I) e Ringer (J, K, L). Setas indicam células que se desprenderam dos embriões. Asteriscos destacam malformações durante os movimentos de epibolia. Meia lua aponta ausência de espaço perivitelino. Estrelas destacam malformações na blastoderme e o triângulo indica malformação de coluna. Barra de escala: 100 μm**95**

Figura 5: Embriões de *Astyanax altiparanae* nos estágios de segmentação e eclosão. Embrião que não foram expostos à irradiação (controle) (A, B); embriões cujos oócitos foram irradiados por 30 segundos (C, D); embriões cujos oócitos foram irradiados por 60 segundos (E, F); embriões cujos oócitos foram irradiados por 90 segundos (G, H) e embriões cujos oócitos foram irradiados por 120 segundos e posteriormente fertilizados (I, J). Asteriscos indicam malformações na cauda; setas finas apontam padrão anormal de diferenciação do vitelo; setas grossas destacam diferenciação cranial anormal e estrelas a malformação e distribuição de vitelo. Barra de escala: 100 μm**101**

Figura 6: Observação dos pronúcleos nos ovos da espécie *Astyanax altiparanae* irradiados por 90s. Ovos com seis minutos pós fertilização, com pronúcleos ainda individualizados (A), ovos com oito minutos pós fertilização, com pronúcleos evidentes e ainda individualizados (B), ovos com dez minutos pós fertilização, com pronúcleos

totalmente fundidos (C) e ovos com doze minutos pós fertilização fusionados (D). Setas indicam a localização dos pronúcleos. Barra de escala: 100 μm102

Capítulo III

Figura 1: Metodologia realizada para irradiação, remoção do córion e fertilização de oócitos de *Astyanax altiparanae* com sêmen de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino.....120

Figura 2: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, cujos oócitos foram fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C); cujo córion do oócito foi removido antes da fertilização (D, E, F); cujo oócito foi irradiado e posteriormente fertilizado (G, H, I) e cujo oócito foi irradiado, com remoção do córion, e posteriormente fertilizado (J, K, L), nos estágios de blástula (J), gástrula (K) e segmentação (L). Asteriscos destacam malformações na região de diferenciação da cauda, setas apontam para deformidades na região cranial, estrelas indicam células se desprendendo do embrião em divisão, círculos destacam mal conformação no vitelo, triângulo aponta para um número reduzido de somitos no mesmo período de incubação, quadrado destaca malformações nos movimentos de epibolia do estágio de gástrula e losango indica malformações nas divisões celulares da blastoderme. Barra de escala: 100 μm131

Figura 3: Desenvolvimento embrionário do híbrido de *Astyanax altiparanae* com *Astyanax fasciatus* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C); cujo córion do oócito de *A. altiparanae* foi removido antes da fertilização com sêmen de *A. fasciatus* (D, E, F); androgenético cujo oócito foi irradiado e posteriormente fertilizado com sêmen de *A. fasciatus* (G, H, I); androgenético cujo oócito foi irradiado, com remoção do córion, e posteriormente fertilizado com sêmen de *A. fasciatus* (J, K, L). Asteriscos destacam malformações na cauda, setas apontam para deformidades na região cranial, círculos destacam malformações no vitelo, triângulo aponta para um número reduzido de somitos no mesmo período de incubação, quadrado destaca malformações nos movimentos de epibolia do estágio de gástrula e losango indica malformações nas divisões celulares da blastoderme. Barra de escala: 100 µm.....132

Figura 4: Desenvolvimento embrionário do híbrido de *Astyanax altiparanae* com *Hyphessobrycon anisitsi* albino nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, imediatamente fertilizados após a extrusão (A, B, C); cujo córion do oócito foi removido antes da fertilização (D, E, F); cujo oócito foi irradiado e posteriormente fertilizado (G, H, I) e cujo oócito foi irradiado, com remoção do córion, e posteriormente fertilizado (J, K, L). Asteriscos destacam malformações na cauda, setas apontam para deformidades na região cranial, estrelas indicam células se desprendendo do embrião em divisão, círculos destacam malformações no vitelo, triângulo aponta para um número reduzido de somitos no mesmo período de incubação, quadrado destaca malformações nos movimentos de epibolia do estágio de gástrula e losango indica malformações nas divisões celulares da blastoderme. Barra de escala: 100 µm.....133

Capítulo IV

Figura 1: Esquema da metodologia de fertilização dos oócitos com sêmen haploide normal e com sêmen fundido.....**151**

Figura 2: Viabilidade do sêmen de *Astyanax altiparanae* antes e após do protocolo de fusão. Viabilidade espermática antes da aplicação do protocolo (A) e após a aplicação do protocolo (B). Análise da motilidade espermática em microscopia de luz, antes da aplicação do protocolo (C) e após a aplicação do protocolo de fusão (D). Setas indicam espermatozoides com fusão.....**156**

Figura 3: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do sêmen de *Astyanax altiparanae* após protocolo de fusão dispérmica, evidenciando os locais de adesão entre os gametas. Fusão a partir da cabeça se estendendo por todo o flagelo (A, B) e fusão pela cabeça (C, D). Barra de escala: 1µm.....**157**

Figura 4: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do sêmen de *Astyanax altiparanae* após protocolo de fusão. A indução à fusão pode provocar agregação de mais de duas células (A, B), bem como fusão de espermatozoides viáveis com células anormais, apresentando aspectos como ausência de flagelo (C). A fusão também pode provocar a junção de um grupo de células próximas, formando “agregados” (D), ou de mais de duas células com espermatozoides sem flagelo (E). O protocolo não garante a

fusão total de todos os espermatozoides, sendo possível individualizar algumas células isoladas (F). Barra de escala: 1 μ m.....158

Figura 5: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de clivagem, blástula, gástrula e segmentação, respectivamente, em cada um dos cinco tratamentos de fertilização. Em A, B, C e D, controle com o dobro da dose inseminante necessária, sem passar pelo protocolo de fusão e com oócitos não irradiados (1); em E, F, G e H, o dobro da dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (2); em I, J, K e L, cinco vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (3); em M, N, O e P, dez vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (4); e em Q, R, S e T, cem vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (5). Asteriscos indicam divisões celulares irregulares no estágio de clivagem e setas destacam células mortas se desprendendo do embrião. Barra de escala: 100 μ m.....159

Lista de Tabelas**Capítulo I**

Tabela 1: Sobrevivência e ploidia dos embriões de *Astyanax altiparanae*, cujos oócitos foram imediatamente fertilizados (controle), e nos tratamentos em que foram estocados por 60, 120, 180 e 240 minutos antes da fertilização.....**59**

Capítulo II

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram estocados em soluções de dPBS, Hanks e Ringer por 30, 60, 90 e 120 minutos após a extrusão artificial.....**93**

Tabela 2: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram fertilizados a fresco (controle) e irradiados com UV por 30, 60, 90, 120 e 150 segundos após a extrusão.....**99**

Tabela 3: Ploidia das larvas de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram fertilizados a fresco (controle) e irradiados com UV por 30, 60, 90 e 120 segundos após a extrusão.....**100**

Capítulo III

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus*. **Legenda** dos tratamentos: L x L (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*), L x F (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*), L x L p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x F p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x L UV (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à radiação UV), L x F UV (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*, cujos oócitos foram expostos à radiação UV), L x L UV p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV) e L x F UV p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV).....**128**

Tabela 2: Desenvolvimento embrionário de oócitos da espécie *Astyanax altiparanae* fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino. **Legenda** dos tratamentos: L x L (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*), L x A (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino), L x L p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x A p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x L UV (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram

expostos à radiação UV), L x A UV (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino, cujos oócitos foram expostos à radiação UV), L x L UV p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV) e L x A UV p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV).....129

Tabela 3: Citometria de fluxo dos doze tratamentos com irradiação, remoção de córion e fertilização.....130

Capítulo IV

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* ao longo dos cinco tratamentos de fusão. **Legenda:** controle com o dobro da dose inseminante necessária, sem passar pelo protocolo de fusão e com oócitos não irradiados (1), o dobro da dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (2), cinco vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (3), dez vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (4) e cem vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (5).....160

Tabela 2: Citometria de fluxo das larvas de *Astyanax altiparanae* provenientes dos cinco tratamentos. **Legenda:** controle com o dobro da dose inseminante necessária, sem

passar pelo protocolo de fusão e com oócitos não irradiados **(1)**, o dobro da dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados **(2)**, cinco vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados **(3)**, dez vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados **(4)** e cem vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados **(5)**.....**161**

Resumo Geral

A androgênese é um mecanismo de reprodução uniparental no qual a progênie possui material genético exclusivamente paterno. Essa forma de manipulação cromossômica pode ser utilizada como estratégia de reconstituição de espécies ameaçadas. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer protocolos de indução à androgênese dispérmica na espécie *Astyanax altiparanae*, padronizando um pacote tecnológico de manipulação da espécie. Inicialmente, foi investigado se o tempo de estocagem dos oócitos (tempo 0 - controle, com 60 minutos pós extrusão (mpe), 120 mpe, 180 mpe e 240 mpe) afetava sua viabilidade em ser fertilizado e a sua ploidia. Os resultados apontam que uma estocagem superior a 60 minutos pós extrusão pode afetar a ploidia e causar reflexos sobre a viabilidade e sobrevivência, com 4,44% das amostras analisadas sendo triploides. Considerando essas informações, foi posteriormente estabelecido um meio de cultura para os oócitos após a extrusão (Ringer, Hanks e dPBS) e a faixa ideal de irradiação UV para inativar o material genético materno (30', 60', 90' e 120' segundos). A solução ideal para estocagem dos oócitos pós extrusão foi a de dPBS, por até 120 minutos, permitindo um largo intervalo para manipulação. Nesse tratamento, a taxa de eclosão foi de $92,08 \pm 1,75\%$. A faixa de irradiação mais eficaz em inativar o material genético materno foi a de 90 mW/cm^2 , com 100% das amostras analisadas haploides. Com o estabelecimento deste protocolo, tornou-se possível os primeiros ensaios para indução à androgênese dispérmica. Foi estabelecido um protocolo de irradiação dos oócitos e fertilização com sêmen de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino, com remoção do córion dos oócitos com enzima pronase, para facilitar a fertilização por mais de um espermatozoide. 100% dos tratamentos que receberam radiação UV e não

tiveram o córion removido com pronase foram haploides, apresentando anormalidades e malformações características da “Síndrome Haploide”. Os oócitos fertilizados com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino que foram previamente irradiados e tiveram o córion removido com pronase apresentaram um percentual de eclosão de larvas normais de $7,90 \pm 4,30\%$, diferindo significativamente do controle de oócitos frescos fertilizados com sêmen da espécie, que foi de $87,36 \pm 12,26\%$ ($P = 0,08$). Os tratamentos com irradiação, remoção do córion e fertilização com sêmen de *Astyanax altiparanae* e de *Hyphessobrycon anisitsi* albino apresentaram, respectivamente, 6,75% e 18,12% de embriões diploides, sinalizando uma alternativa para a produção de androgênicos diploides em espécies neotropicais. Outra estratégia de indução à androgênese dispérmica foi a fertilização dos oócitos irradiados com sêmen fundido. Foi avaliada a viabilidade após fusão e a morfologia dos gametas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Após a análise, foram realizados cinco tratamentos baseados na dose inseminante para a espécie, para fertilização com sêmen fundido. O protocolo utilizado para fusão dispérmica apresentou 95,5% de viabilidade (células vivas). A microscopia eletrônica apontou a ocorrência de agregados de espermatozoides e fusão com células sem flagelo. O tratamento com sêmen fundido em menor concentração de dose inseminante apresentou percentual de fertilização de 39,08%, com eclosão de 40,06%. Destacou-se um percentual de eclosão de larvas normais de 34,13% nesse tratamento. Além disso, o tratamento também apresentou o maior índice de indivíduos diploides, com 33,33%. Os resultados apontam para um protocolo de indução à androgênese dispérmica na espécie, sugerindo que apesar da fertilização ser menor em tratamentos com dose inseminante reduzida, o percentual de indivíduos diploides é maior, devido à possibilidade de fertilização com mais espermatozoides fundidos. A reunião desses

resultados representa um pacote inédito de manipulação cromossômica e reprodução uniparental em espécies nativas.

General Abstract

Androgenesis is uniparental reproductive mechanism in which the offspring presents exclusively paternal inheritance. The technique can be used as a strategy for the conservation of endangered species by chromosome manipulation. The present work was developed with the purpose of establishing protocols for induction of dispermic androgenesis in *Astyanax altiparanae*, establishing a set of procedures for chromosome manipulation. Initially, it was established whether the storage time of the oocytes affected its viability and its ploidy. The results indicate that a storage above 60 minutes after extrusion can affect the ploidy, viability and survival, with 4.44% of the analyzed samples being triploids. Considering this information, a culture medium for the oocytes after extrusion and the ideal range of UV irradiation were later established in order to inactivate the maternal genome. The best solution for oocyte storage was dPBS, which maintained the oocytes more than 120 minutes, allowing a wide range for manipulation. In this treatment, the hatching rate was $92.08 \pm 1.75\%$. The most effective irradiation range to inactivate the maternal genome was $90 \text{ mW} / \text{cm}^2$, with 100% of analyzed samples as haploid. With the establishment of this protocol, the first trials for induction of dispermic androgenesis became feasible. A protocol of oocyte irradiation and fertilization with semen of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* and albino *Hyphessobrycon anisitsi*, with removal of the chorion from oocytes with pronase, was established to facilitate fertilization by more than one spermatozoa. 100% of the UV

treated oocytes and intact chorion were haploids, presenting abnormalities and malformations characteristic of the "Haploid Syndrome". Oocytes fertilized with albino *Hyphessobrycon anisitsi* semen that were previously irradiated and had the chorion removed with pronase had a normal hatch percentage of $7.90 \pm 4.30\%$, differing significantly from the control of fresh oocytes fertilized with semen, which was $87.36 \pm 12.26\%$ ($P = 0.08$). The treatments with irradiation, removal of the chorion and fertilization with semen of *Astyanax altiparanae* and albino *Hyphessobrycon anisitsi* presented, respectively, 6.75% and 18.12% of diploid embryos, signaling an alternative for the production of androgenetic diploids in neotropical species. Another strategy of induction to the dispermic androgenesis was the fertilization of irradiated oocytes with fused sperm. The viability after fusion and the morphology of the gametes by Scanning Electron Microscopy (SEM) were evaluated. After the analysis, five treatments were performed based on the inseminating dose for the species, for fertilization with fused sperm. The protocol used for dispermic fusion had 95.5% viability (live cells). Electron microscopy pointed to the occurrence of sperm aggregates and fusion with cells without flagella. The treatment with fused sperm in lower concentration of inseminating dose showed a percentage of fertilization of 39.08%, with hatching of 40.06%. A percentage of normal larvae hatching of 34.13% in this treatment was obtained. In addition, the treatment also had the highest percentages of diploid individuals (33.33%). The results point to a protocol for the induction of dispermic androgenesis in the species, suggesting that although fertilization is lower in treatments with reduced insemination dose, the percentage of diploid individuals increased, due to the possibility of fertilization with more fused spermatozoa. The gathering of these results represents an innovative set of chromosome manipulation and uniparental reproduction in native species.

Introdução Geral

1. Espécies experimentais

Diante da necessidade em padronizar protocolos básicos de reprodução para que se possa avançar no estabelecimento de técnicas de manipulação e biotecnologia entre as espécies nativas, tem sido desenvolvidos protocolos de manipulação há cerca de cinco anos com a espécie *Astyanax altiparanae*, com o objetivo de consolidar um pacote tecnológico aplicado de conhecimentos sobre a espécie. Entre estes estudos, foram desenvolvidos protocolos de estocagem dos gametas (Yasui *et al.*, 2015), morfologia e desenvolvimento embrionário para manipulação cromossômica e quimerismo (Pereira – Santos *et al.*, 2016), produção de indivíduos triploides (Adamov *et al.*, 2016) e parâmetros de crescimento e propagação destes animais (Nascimento *et al.*, 2017).

Entre as principais características que tornam a espécie *A. altiparanae* um interessante modelo para manipulação e biotecnologia aplicada às espécies nativas, destacam-se sua ampla distribuição nacional, o seu crescimento e rusticidade. Este caracídeo é amplamente distribuído pela bacia do rio Paraná e entre a ictiofauna do rio Iguaçu. A espécie apresenta grande capacidade de adaptação aos mais variados tipos de dietas provenientes do seu ecossistema natural, em decorrência de fatores ambientais que possam provocar falta de alimentos ou acúmulo de outras fontes (Andrian *et al.*, 2001).

Outros aspectos ligados à sua reprodução também facilitam a perpetuação em ambientes diversificados, a destacar a alta taxa de fertilização que apresentam, além do fato de possuírem ovos pequenos com rápido desenvolvimento (Agostinho *et al.*, 1999;

Pereira – Santos *et al.*, 2016). As fêmeas têm sua primeira maturação sexual próximo de 69,00 mm de comprimento total (CT), com período de reprodução geralmente se estendendo de setembro a março, sendo a desova parcelada e a fecundação externa, apresentando cuidado passivo com a prole e realizando pequenas migrações na natureza. A desova da espécie possui picos que são diretamente influenciados pela temperatura da água e índices de chuva (Nakatani *et al.*, 2001).

Presente entre as espécies mais comuns da América do Sul, o lambari-do-rabo-vermelho (*Astyanax fasciatus*) se diferencia das demais espécies do gênero por apresentar coloração avermelhada em sua nadadeira caudal. Possui grande relevância na cadeia alimentar do ecossistema, além de ser um importante bioindicador de poluição dos rios. A espécie apresenta táticas reprodutivas diferenciadas que variam com aspectos ambientais, apresentando desova total ou parceladas. São reofílicos, mas não realizam longas migrações (Schulz e Martins, 2000; Silva *et al.*, 2010).

A espécie *Hyphessobrycon anisitsi*, conhecida como Tetra Buenos Aires, está distribuída pela bacia do rio Paraná, no Brasil, Paraguai e Argentina. Assim como outras espécies do gênero, apresenta ganchos ósseos em todas as nadadeiras. O dimorfismo sexual se dá pela diferença no comprimento total na fase adulta e pela presença, nos machos, dos ganchos ósseos na nadadeira pélvica (Miquelarena e Lopez, 2006; Carvalho e Langeani, 2013).

2. Androgênese como ferramenta de reconstituição em peixes

A biotecnologia aplicada à reprodução já vem sendo largamente investigada em áreas como criopreservação de gametas (Kusuda *et al.*, 2005; Nynca *et al.*, 2016), transplante celular e quimerismo (Saito *et al.*, 2010; Yasui *et al.*, 2011), manipulação cromossômica (Dunham, 2004; Dong *et al.*, 2013), produção de indivíduos estéreis através de poliploidia (Fujimoto, 2010; Li *et al.*, 2016) e androgênese (Komen e Thorgaard, 2007; Hou *et al.*, 2015). No entanto, protocolos e estudos sobre a biologia reprodutiva detalhada ainda são escassos entre as espécies nativas.

A androgênese, uma dessas ferramentas, pode ser definida como um procedimento de manipulação cromossômica que acarreta, por reprodução uniparental, um embrião com genoma exclusivamente derivado do genoma paterno, sem qualquer contribuição do núcleo materno. O oócito é enucleado fisicamente ou por irradiação, e a fertilização ocorre com espermatozoide normal. O processo resulta em formação de embriões haploides. Os peixes apresentam características biológicas que representam vantagens técnicas em relação aos demais vertebrados por apresentarem um sistema menos especializado, permitindo certas manipulações que são impraticáveis em outros. Algumas das facilidades são: fecundação externa, alta fecundidade e diferenciação sexual controlável (Thorgaard *et al.*, 1992; Morishima *et al.*, 2011).

Na androgênese, uma das primeiras etapas de indução se refere à extrusão dos oócitos, o seu armazenamento e posterior tratamento para inativação do material genético materno, por meio de irradiação UV. Para que seja possível realizar com sucesso essa etapa e manter a viabilidade da desova, é necessária a padronização de um protocolo de manutenção dos oócitos em ambiente externo por uma determinada faixa de tempo. Em paralelo, a estocagem dos oócitos de peixes pode afetar diretamente a sua

morfologia, estrutura e, conseqüentemente, a sua viabilidade (Aegerter e Jalabert, 2013; Samarin *et al.*, 2015). Esta estocagem pode, inclusive, estar relacionada com o surgimento de triploides e mosaicos naturais, afetando diretamente a ploidia, o crescimento e a sobrevivência das progênies (Nomura *et al.*, 2013).

Como técnica da biotecnologia aplicada, a androgênese apresenta vasto potencial de aplicações, incluindo o rápido estabelecimento de linhagens puras através de sêmen criopreservado (Arai *et al.*, 1992; Thorgaard *et al.*, 1990), propagação mediada de espécies de interesse econômico (Arai *et al.*, 2001) e produção de indivíduos triploides e tetraploides a partir de fusão de gametas (Nam e Kim, 2004; Zou *et al.*, 2004).

Entre os protocolos de indução, destacam-se na literatura as técnicas de irradiação dos oócitos por raios gama ou X (Arai *et al.*, 1979) e a irradiação ultravioleta dos oócitos e posterior fertilização com sêmen fresco ou criopreservado (Arai *et al.*, 1995; Bongers *et al.*, 1995; Yasui *et al.*, 2010). A irradiação UV apresenta vantagens em relação às demais técnicas e vem sendo mais explorada como protocolo de indução à androgênese.

Seu estabelecimento já é bem padronizado na inativação de espermatozoides para técnicas de ginogênese e, além disso, é capaz de evitar a ocorrência de resíduos de fragmentos de DNA, que posteriormente podem provocar malformações e comprometer a sobrevivência ao longo da embriogênese (Arai *et al.*, 1992). Diversos estudos também destacam que a irradiação ultravioleta é mais eficaz em relação à irradiação ionizante na inativação cromossômica dos gametas e posteriores viabilidade e sobrevivência das progênies (Lin e Dabrowski, 1998; Yoshikawa *et al.*, 2008; Ocalewicz *et al.*, 2009).

Mesmo assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de um estudo detalhado da biologia reprodutiva da espécie e a padronização de uma faixa ideal de irradiação, eficaz na inativação cromossômica do material materno e que ao mesmo tempo não comprometa significativamente a posterior fertilização e sobrevivência. A androgênese não será bem sucedida se houver qualquer fragmento materno de DNA, e a faixa de irradiação UV dos oócitos é fundamental neste sentido.

Fragmentos de DNA, provavelmente resíduos de cromossomos maternos, foram destacados em indivíduos androgenéticos haploides da espécie *Misgurnus anguillicaudatus* (Arai *et al.*, 1992). A ocorrência não se justifica pela ineficiência na indução pela técnica de irradiação UV em si, mas provavelmente pela dose e tempo de irradiação não terem sido os ideais para a espécie em questão, daí a necessidade de padronizações constantes do protocolo de acordo com os requisitos de cada espécie.

Ferramentas de confirmação são muito importantes para o refinamento da técnica. Cruzamentos com gametas de espécies diferentes podem ser estratégias de fertilização artificial eficiente para posterior confirmação da androgenia nas progênes. A ocorrência de híbridos entre os tratamentos que passaram por irradiação atuam como indicadores da eficiência dos protocolos. A técnica vem sendo desenvolvida como um tipo de controle para a expressão de indivíduos androgenéticos em protocolos com peixes (Stanley e Jones, 1976; Grunina *et al.*, 1995; Marengoni e Onoue, 1998).

A utilização de gametas de espécies diferentes – oócitos de *Astyanax altiparanae* e espermatozoides de *Hyphessobrycon anisitsi* albino ou *Astyanax fasciatus* – para os ensaios de indução à androgênese também tiveram seus resultados comparados e analisados por citometria de fluxo. A viabilidade dos dois híbridos também foi avaliada e os resultados são apresentados. No entanto, independente da técnica utilizada para

indução à androgênese (utilização de gametas de espécies diferentes, irradiação iônica ou por raios UV, indução física), uma alta taxa de mortalidade entre as progênes é relatada na literatura indexada (Pandian e Kirankumar, 2003).

Em espécies de teleósteos, cerca de 84% de mortalidade é relatada entre indivíduos androgenéticos já nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. Além disso, o genoma haploide também regula a escala de tempo e sequência dos eventos, comprometendo morfologia e sobrevivência posterior (Pandian e Kirankumar, 2003). Dessa forma, a eficácia dos protocolos de indução à androgênese é comprometida pela baixa sobrevivência em decorrência da formação esperada de indivíduos haploides.

É necessário restaurar de alguma forma a diploidia desses indivíduos para que possa haver sobrevivência e posterior propagação. Para isso, podem ser utilizadas ferramentas como choque de temperatura ou pressão para suprimir a primeira clivagem mitótica do embrião. Se o choque for aplicado durante a prófase da mitose, o resultado será a duplicação do conjunto cromossômico haploide, seguido de divisões celulares normais (Komen e Thorgaard, 2007).

Os choques de temperatura podem ter variações pós – fertilização. A acurácia está diretamente relacionada com um conhecimento detalhado da biologia e embriogenese da espécie em questão, podendo haver variações até entre espécies do mesmo gênero. Por isso, a eficiência dos protocolos demanda estes estudos de base para que se possam obter índices satisfatórios com a androgênese (Komen e Thorgaard, 2007).

A sobrevivência e viabilidade de indivíduos haploides decorrentes destes tratamentos é nula, podendo ser, inclusive, utilizadas como indicadores e parâmetros

para avaliação do sucesso do protocolo utilizado para inativar o material genético materno (ver Capítulo 2). No entanto, isto não garante totalmente a origem paterna do embrião, uma vez que o método pode estar sujeito a falhas, sendo necessária, assim, a aplicação de marcadores moleculares como ferramentas de confirmação. Análises de RAPD e microssatélites, surgem como alternativas eficientes na determinação da origem do material genético de peixes gerados por androgênese (Arai, 2001; Kirankumar e Padian, 2003; Nagoya, 2010).

Outra técnica de restauração da diploidia após a inativação do material genético materno por irradiação UV é a fertilização posterior com sêmen diploide ou por mecanismos que permitam a fertilização por mais de um espermatozoide. Dessa forma, a indução de androgenéticos interespecíficos, decorrentes da fertilização com espermatozoides haploides fundidos de espécies correlatas ao doador de oócitos, pode ser uma ferramenta promissora para o estabelecimento da técnica com níveis mais satisfatórios de sobrevivência (Clifton e Pandian, 2008).

Para que seja possível a utilização da técnica, é necessária a padronização de um protocolo que permita a fusão de células de espermatozoides. Em peixes, alguns estudos foram realizados nesse sentido, através de soluções que atuam por intervalos pré – determinados sobre o sêmen coletado. Assim, para a espécie *Hemigrammus caudovittatus*, ocorre fusão dos espermatozoides em solução de polietileno glicol por 7 minutos (Clifton e Pandian, 2008) e, em *Astyanax altiparanae*, a fusão foi descrita e observada pelo presente grupo de pesquisa com solução de $MgCl_2$, por 10 minutos (Spandri, 2016). Essa característica também é espécie – específica e demanda estudos detalhados sobre a biologia reprodutiva das espécies para que protocolos satisfatórios de fusão sejam obtidos.

3. Desenvolvimento do projeto

A conservação de espécies de peixes é uma área desafiadora que demanda uma diversidade de pesquisas sobre a biologia das espécies aliada a um constante aprimoramento de técnicas de produção e propagação mediada. Entre as bases fundamentais que permeiam estas investigações, destaca-se a reprodução.

Diversas técnicas voltadas para a área de preservação, tais como manipulação cromossômica, transplante celular, clonagem e produção de poliploides dependem estritamente do sucesso em reproduzir esses animais em cativeiro e ter um conhecimento detalhado da sua biologia reprodutiva e dos requisitos para seu crescimento e propagação.

Esta área do conhecimento torna-se, assim, de fundamental importância, principalmente quando se leva em consideração a diversidade de espécies atualmente ameaçadas de extinção e também a necessidade em aprimorar parâmetros zootécnicos entre aquelas que apresentam potencial para produção aquícola.

Com o desenvolvimento e aprimoramento destes protocolos, diversos aspectos relacionados com a biologia reprodutiva da espécie e sua manipulação foram levantados e elucidados pelo presente grupo de pesquisa. No entanto, para que o refinamento destes dados fosse possível, uma série de características e eventos da biologia da espécie foi levada em consideração.

Inicialmente, como os protocolos estão diretamente relacionados com a manipulação dos gametas, todos os aspectos relacionados com a qualidade, produção e manutenção dos mesmos foram levantados para que tais características não exercessem influência direta sobre a obtenção dos resultados preliminares.

Manter a viabilidade dos oócitos após a sua fertilização e conseqüentemente a sua sobrevivência e crescimento é fundamental para o estabelecimento da técnica de androgênese e para o refinamento dos resultados obtidos com a indução da técnica. Desta forma, o primeiro capítulo da pesquisa apresentada está diretamente relacionado com a apuração da hipótese de que, no momento do armazenamento e estocagem dos oócitos para o procedimento de indução à androgênese, parâmetros de qualidade e até mesmo a ploidia dos gametas podem ser afetados.

Os resultados obtidos serviram de subsídio para adaptações e otimização dos protocolos e, conseqüentemente, para o refinamento da técnica com a espécie. Além de estar inserida neste contexto, a pesquisa também é muito relevante em ensaios com reprodução e biotecnologia das espécies, visto que a manipulação dos gametas é uma etapa necessária à maioria dos estudos correlatos e que pode afetar e influenciar diretamente as conclusões e resultados obtidos nas pesquisas.

No Capítulo II desta pesquisa, estas etapas de padronização do processo são discutidas e estabelecidas para a espécie *Astyanax altiparanae*. Neste capítulo, são apresentadas informações que são requisitos para o estabelecimento de uma faixa ideal de irradiação UV para inativação do material genético materno da espécie, como a necessidade de uma solução que represente o fluído ovariano e mantenha a viabilidade dos gametas pós extrusão, servindo de meio de dispersão dos oócitos durante o processo de irradiação.

Aspectos relacionados ao sêmen também são discutidos e apresentados. A eficiência dos protocolos de irradiação na inativação do material genético dos oócitos foi avaliada por meio de citometria de fluxo, sendo a sobrevivência e viabilidade avaliadas através da análise do desenvolvimento embrionário e eclosão.

Em uma das etapas da pesquisa, foram estabelecidos dois protocolos de indução de androgenéticos a partir de espermatozoides de espécies diferentes. No Capítulo III, são descritos os resultados obtidos com a irradiação UV dos oócitos da espécie *Astyanax altiparanae* e fertilização com espermatozoides frescos de duas espécies de caracídeos, o lambari do rabo vermelho (*Astyanax fasciatus*) e o Tetra Buenos Aires (*Hyphessobrycon anisitsi*) albino.

No Capítulo IV, são apresentados os resultados obtidos a partir da inativação do material genético da espécie *Astyanax altiparanae* e posterior fertilização com diferentes doses inseminantes de sêmen fundido da espécie. O protocolo foi realizado a partir dos estudos realizados por Spandri (2016) para fusão de espermatozoides e por Pereira – Santos *et al.* (2016) para descrição dos gametas da espécie. Os resultados foram analisados e comparados por citometria de fluxo e o desenvolvimento embrionário foi detalhadamente descrito, com viabilidade e sobrevivência.

O estudo traz informações importantes sobre técnicas de manipulação cromossômica em espécies nativas de peixes. Como já foi previamente discutida, a maioria das etapas depende de conhecimentos da biologia reprodutiva que são sempre espécie – específicos, ou seja, sua aplicação não pode ocorrer com sucesso sem ter como base tais pesquisas.

São escassos os estudos com androgênese em espécies nativas na literatura. Os dados e informações levantados neste trabalho não só servirão como base para o avanço dos ensaios em biotecnologia aplicada para as espécies de interesse econômico ou entre as seriamente ameaçadas de extinção, como também somam à literatura indexada sobre as metodologias com outras espécies.

A tese está dividida em quatro capítulos: I – Fertilização tardia dos oócitos de *Astyanax altiparanae*: implicações sobre a morfologia e ploidia dos embriões; II - Inativação do material genético materno por irradiação UV e determinação da solução para estocagem de oócitos da espécie *Astyanax altiparanae*; III - Fertilização dos oócitos irradiados da espécie *Astyanax altiparanae* com sêmen de *A. fasciatus* e de *A. hemigrammus*; IV - Fatores que afetam a androgênese dispérmica em peixes: Dose inseminante aumenta ocorrência de diploides.

Cada capítulo traz um referencial técnico inédito em sua metodologia, sempre aplicado às condições ambientais e às espécies nativas. No Capítulo I, é destacada a importância da estocagem ideal e da fertilização artificial das desovas, evidenciando como o tempo para fertilização pode alterar até mesmo a ploidia das amostras e, conseqüentemente, sobrevivência e confiabilidade dos resultados de uma pesquisa.

No Capítulo II, uma dose ideal de irradiação dos oócitos da espécie *Astyanax altiparanae* é ineditamente fornecida. Para isso, também são apresentadas diferentes concentrações de soluções para manutenção de oócitos após a extrusão, com o objetivo de manter a sua viabilidade e morfologia durante estocagem. Os resultados são analisados e comparados por citometria de fluxo, uma importante ferramenta de confirmação. Para posterior publicação deste artigo científico, haverá um refinamento dos resultados apresentados, sendo realizadas análises em molecular.

No Capítulo III, apresenta-se o desenvolvimento progressivo das etapas do trabalho com as fertilizações dos oócitos irradiados de *A. altiparanae*. Foram utilizados espermatozoides das espécies *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino. Os promissores resultados alcançados com a técnica representam os primeiros dados obtidos com indução à androgênese em espécies nativas.

Para publicação deste artigo científico, serão realizadas análises em PCR e teste de paternidade, evidenciando a herança dos parentais utilizados. O protocolo será otimizado também para criação e desenvolvimento das progênes para análises posteriores, evidenciando as características morfológicas paternas de *Astyanax fasciatus* ou *Hyphessobrycon anisitsi* albino.

Como conclusão, o Capítulo IV traz um inédito protocolo que só foi possível graças à reunião das informações levantadas por todos os capítulos prévios. Obteve-se a fusão dos espermatozoides da espécie *Astyanax altiparanae* através de trabalho prévio realizado pelo grupo de pesquisa (Spandri, 2016).

A partir daí, foi possível realizar a indução à androgênese dispérmica através da irradiação UV dos oócitos e posterior fertilização com sêmen fundido, em diferentes doses inseminantes. Os resultados inéditos são os primeiros dados referentes à androgênese com espécies nativas por meio de fusão de espermatozoides e irradiação UV dos oócitos.

Referências Bibliográficas

Aegerter, S.; Jalabert, B. **Effects of post – ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploidy fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** Aquaculture. 231. 59 – 71. 2004.

Adamov, N. S. M.; Nascimento, N.; Maciel, E. C.; Pereira – Santos, M.; Senhorini, J.; Calado, L.; Evangelista, M. M.; Nakaghi, L. S. O.; Fujimoto, T.; Yasui, G. S. **Triploid induction in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* using temperature shock.** Aquaculture Research. *In press*. 2016.

Agostinho, A. A *et al.* Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J.G.; STRASKRABA, M. (Ed.). Theoretical reservoir ecology and its applications. São Carlos: **International Institute of Ecology-IEE**; AH Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p.227-265, 1999.

Andrian, I. F.; Silva, H. B. R., Peretti, D. **Dieta de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), da área de influência do reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil.** Acta Scientiarum Maringá, v. 23, n. 2, p. 435-440, 2001.

Arai, K., Onozato, H. and Yamazaki, F. **Artificial androgenesis induced with gamma irradiation in masu salmon, *Oncorhynchus masou*.** Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ., 30, 181–186. 1979.

Arai, K.; Masaoka T.; Suzuki R. **Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs.** Nippon Suisan Gakkaishi 58:1197–1201. 1992.

Arai K.; Ikeno, M.; Suzuki R. **Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa from natural tetraploids.** *Aquaculture* 137:131–138. 1995.

Arai, K. **Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan.** *Aquaculture* 197, 205–228. 2001.

Bongers, A. B. J.; Boza Abarca, J.; Zandieh Doulabi, B.; Eding, E. H.; Komen, J.; Richter, C. J. J. **Maternal influence on development of androgenetic clones of common carp, *Cyprinus carpio* L.** *Aquaculture* 137:139–147. 1995.

Carvalho, F. R.; Langeani, F. ***Hyphessobrycon uaiso*: new characid from the Rio Grande, upper rio Paraná basin, Minas Gerais state (Ostariophysi: Characidae), with a brief comment about some types of *Hyphessobrycon*.** *Neotrop. Ichthyol.* 11(3). 2013.

Clifton, J. D.; Pandian, T. J. **Dispermic induction of interspecific androgenesis in the fish, Buenos Aires tetra using surrogate eggs of widow tetra.** *Current Science*, 95 (1), 2008.

Dong, J.; Murakami, M.; Fujimoto, T.; Arai, K. **Genetic characterization of the progeny of a pair of the tetraploid silver crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*.** *Fisheries Science.* 79 (6). 2013.

Dunham, R. A. **Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches.** CABI, 2004.

Fujimoto, T., Nishimura, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Yamaha, E., & Arai, K. **Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish.** Proceedings of the National Academy of Sciences, *107*(40), 17211-17216. 2010.

Grunina, A. S.; Recoubratsky, A. V.; Emelyanova, O. V.; Neyfakh, A. A. **Induced androgenesis in fish: production of viable androgenetic diploid hybrids.** *Aquaculture*. 1(4), 137 – 149. 1995.

Hou, J.; Saito, T.; Fujimoto, T.; Arai, K. **Androgenetic doubled haploids induced without irradiation of eggs in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*).** *Aquaculture*. 420-421: 57 – 63. 2015.

Kirankumar, S.; Pandian, T. J. **Production and progeny testing of androgenetic rosy barb, *Puntius conchoni*.** *J. Exp. Zool.*, 2003.

Komen, H., Thorgaard, G. H. **Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review.** *Aquaculture*, 269(1), 150-173. 2007.

Kusuda, S., Koide, N., Kawamura, H., Teranishi, T., Nakajima, J. I., Yamaha, E., Ohta, H. **Cryopreservation diluents for spermatozoa of Sakhalin taimen *Hucho perryi*.** *Fisheries Science*, 71(2), 293-298. 2005.

Li, Y. J.; Gao, Y.; Zhou, H.; Arai, K. **Aneuploid progenies of triploid hybrids between diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China.** *Genetica*. DOI: 10.1007/s10709-016-9928-8. 2016.

Lin, F.; Dabrowski, K. **Androgenesis and homozygous gynogenesis in Muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry.** *Molecular Reproduction and Development*. 49: 10-18. 1998.

Marengoni, N. G.; Onoue, Y. **Ultraviolet-induced androgenesis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid Nile x blue tilapia, *O. aureus* (Steindachner).** *Aquaculture Research*. 29 (5), 359 – 366. 1998.

Morishima, K.; Fujimoto, T.; Sato, M; Kawae, A.; Zhao, Y.; Yamaha, E.; Arai, K. **Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to 243 induce androgenesis**

in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). BMC Biotechnology 244 v.11, p.1-16, 2011.

Miquelarena, A. M.; López, H. L. ***Hyphessobrycon togoi*, a new species from the La Plata basin (Teleostei: Characidae) and comments about the distribution of the genus in Argentina.** *Revue Suisse de Zoologie*. 113(4): 817-828. 2006.

Nagoya, H. **Production of androgenetic amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* with dispermy fertilization.** Fisheries Science [S.I.], 76 (2), 305-313, 2010.

Nakatani, K., Agostinho, A. A, Baumgartner, G., Bialetzki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C., Pavanelli, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** EDUEM. Maringá. 378 pp., 2001.

Nam, Y. K.; Kim, D. S. **Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*).** *Aquaculture* 236, 575–582. 2004.

Nascimento, N. F.; Pereira – Santos, M.; Piva, L. H.; Manzini, B.; Fujimoto, T.; Senhorini, J. A.; Yasui, G. S.; Nakaghi, L. S. O. **Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*.** *Aquaculture*. *In press*. 2016.

Nomura, K.; Takeda, Y.; Unuma, T.; Morishima, K.; Tanaka, H.; Arai, K.; Ohta, H.

Post ovulatory oocyte aging induces spontaneous occurrence of polyploids and mosaics in artificial fertilization of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. 404-405; 15-21. 2013.

Nynca, J.; Judycka, S.; Liszewska, E.; Ciereszko, A. **Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from salmonidae species.** *Aquaculture*. 464. 340 – 348. 2016.

Ocalewicz, K.; Dobosz, S.; Kuzminski, H.; Goryczko, K. **Formation of chromosome aberrations in androgenetic rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.** *Journal of Fish Biology*. 75, 2373-2379. 2009.

Pereira-Santos, M.; Yasui, G. S.; Xavier, P. L. P.; Adamov, N. S. M.; Nascimento, N. F.; Fujimoto, T.; Senhorini, J. A.; Nakaghi, L. S. O. **Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae).** *Zygote* 1-13. 2016.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., & Yamaha, E. **Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish.** *International Journal of Developmental Biology*, 54(10), 1481-1486. 2010.

Schulz, U. H.; Martins Júnior, H. ***Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of rio dos Sinos, RS, Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*. 61 (4), 615 – 622. 2000.

Silva, J. P. S.; Muelbert, A. E.; Oliveira, E. C.; Fávoro, L. F. **Reproductive tactics used by the lambari *Astyanax fasciatus* in three water supply reservoirs in the same geographic region of the upper Iguçu River.** *Neotropical Ichthyology*. 8(4), 885-892. 2010.

Stanley, J. G.; Jones, J. B. **Morphology of androgenetic and gynogenetic grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes).** *Journal of Fish Biology*, 9 (6), 523 – 528. 1976.

Thorgaard, G. H., Sheerer, P. D.; Hershberger, W. K.; Myers, J.M. **Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival.** *Aquaculture* 85, 215-221. 1990.

Thorgaard, G. H.; Sheerer, P. D.; Zhang, J. **Integration of chromosome set manipulation and transgenic technologies for fishes.** *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1, 251-256.1992.

Yasui, G. S., Senhorini, J. A., Shimoda, E., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Fujimoto, T., Silva, L. A. **Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish.** *Animal*, 9(03), 464-470. 2015.

Yoshikawa, H.; Morishima, K.; Fujimoto, T.; Arias-Rodrigues, L.; Yamaha, E.; Arai, K. **Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach: a review.** *J. Appl. Ichthyol.* 24, 410–414. 2008.

Zou, S.; Li, S.; Cai, W.; Zhao, J.; Yang, H. **Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*).** *Aquaculture* 238, 155–164. 2004.

Capítulo I

Capítulo I: Fertilização tardia dos oócitos de *Astyanax altiparanae*: Implicações sobre a morfologia e ploidia dos embriões

Sumário

Resumo.....	46
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	48
Resultados.....	54
Discussão.....	64
Referências.....	67
Agradecimentos.....	74

Resumo

Em peixes, diversos fatores podem afetar a reprodução, a viabilidade e a sobrevivência durante o manejo em cativeiro. Desta forma, a reprodução das espécies deve ser otimizada de forma a potencializar a qualidade e desenvolvimento da desova e da fertilização. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de elucidar se o tempo de estocagem dos oócitos após sua extrusão até a fertilização artificial em si pode afetar a ploidia da progênie e conseqüentemente a sobrevivência e a viabilidade dos embriões na espécie *Astyanax altiparanae*. Fêmeas e machos da espécie receberam indução hormonal, sendo os oócitos armazenados em solução dPBS e fertilizados com sêmem em solução de Ringer modificado (motilidade espermática superior a 90%). As fertilizações ocorreram imediatamente após a extrusão (tempo 0 - controle), com 60 minutos pós extrusão (mpe), 120 mpe, 180 mpe e 240 mpe. A partir da fertilização, foram mensurados os índices de sobrevivência em cada estágio da embriogênese, descritas as principais malformações recorrentes ao longo do desenvolvimento e, após eclosão e larvicultura, a ploidia das amostras foi analisada através de citometria de fluxo e esfregaço sanguíneo. O maior percentual de eclosão foi com 60 mpe ($88,93 \pm 5,15\%$; $P = 0,015$) e o tratamento 180 mpe teve o maior percentual de larvas anormais ($95,76 \pm 12,67\%$; $P = 0,012$). No grupo controle, 100% das amostras foram diploides. No tratamento com 60 mpe, $95,56 \pm 4,44\%$ das amostras eram diploides e $4,44 \pm 4,44\%$ triploides. Com 120 mpe, $94,44 \pm 9,62\%$ das amostras eram diploides e $5,56 \pm 5,56\%$ triploides. 100% das amostras eram diploides com 180 mpe e em 240 mpe não houve sobrevivência. Estes resultados mostram que o tempo até a fertilização dos oócitos pode

alterar a ploidia dos mesmos, comprometendo estudos de reprodução e biotecnologia aplicada em peixes.

Palavras – chave: *Astyanax altiparanae*, embriogênese, gametas, poliploidia, reprodução.

Introdução

A biotecnologia aplicada à reprodução é uma ferramenta fundamental para o aperfeiçoamento dos estudos de produção e preservação das espécies de peixes. Vários modelos foram estabelecidos com sucesso para algumas espécies em técnicas como quimerismo e produção de transgênicos (Tanaka *et al.*, 2009; Yasui *et al.*, 2014), androgênese e ginogênese (Komen e Thorgaard, 2007), fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (Otani, *et al.*, 2009; Oehninger, 2011), todas apresentando potencial para aplicação em larga escala.

Estes estudos são sempre baseados em parâmetros relacionados diretamente à fertilização, ao desenvolvimento embrionário e aos indicadores de anormalidade das taxas de eclosão, que são críticos para a análise da viabilidade dos protocolos. Contudo, não são elucidadas as causas específicas destas anormalidades durante os ensaios. O manejo reprodutivo e a extração de gametas em condições laboratoriais podem influenciar diretamente o resultado final dessas técnicas, incluindo testes de

manipulação cromossômica, que dependem diretamente da viabilidade e sobrevivência dos embriões e, conseqüentemente, da qualidade dos gametas manipulados e da otimização dos gametas (Sun *et al.*, 2005; Piferrer *et al.*, 2009).

Entre as causas destas anormalidades pode-se destacar possíveis alterações na ploidia destes animais, originadas durante a implementação das técnicas. A poliploidia em peixes pode ocorrer espontaneamente e ser devida a diversos fatores. Também são relatados casos de ginogenéticos diploides espontâneos sem qualquer manipulação durante experimentos com técnicas de manipulação (Morelli *et al.*, 1983, Maistro *et al.*, 1994, Machado *et al.*, 2012). A ocorrência dessas variações espontâneas pode comprometer a precisão dos resultados em trabalhos de manipulação cromossômica e micromanipulação.

Diante disto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de elucidar se o armazenamento dos oócitos após a extrusão podem ser um dos fatores capazes de afetar a ploidia na espécie de caracádeo neotropical *Astyanax altiparanae*, um interessante modelo para estudos em biotecnologia aplicada e manipulação cromossômica.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no uso de Animais do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEUA / CEPTA #02031.000033/2015-11).

Indução à reprodução e fertilização

Nos experimentos, foram utilizados exemplares adultos da espécie *Astyanax altiparanae*. A fim de estabelecer um estoque de reprodutores, os peixes foram coletados no rio Mogi Guaçu (21.925706 ° S, 47,369496 ° W) e mantidos em tanques de alvenaria de 1000 m² no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA / ICMBio), em Pirassununga, SP, Brasil. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com pellet comercial (1 mm de diâmetro, 45% de proteína bruta, 3200 kcal kg⁻¹). Para a fertilização *in vitro*, foram utilizados os procedimentos para a maturação de gametas, extrusão e fertilização descritos por Yasui *et al.*, 2014.

Machos (~ 6 cm de comprimento total) e fêmeas (~ 9 cm de comprimento total) foram anestesiados com mentol (100 mg L⁻¹) e induzidos hormonalmente com solução de OVOPEL® [(D-Ala6, Pro9-Net) -mGnRH + metoclopramida] (3 mg kg⁻¹ de peso vivo para machos e fêmeas) na base da nadeira peitoral. Após a injeção, os peixes foram mantidos em um aquário de 400 litros, com temperatura controlada em 26°C. Quando o comportamento de desova foi iniciado, os peixes foram recolhidos e anestesiados como mencionado previamente. O sêmen foi coletado através de massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal, utilizando uma micropipeta de 1000 µL Eppendorf (Eppendorf, Alemanha) e imediatamente transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 400 µl de solução de Ringer modificado (NaCl 128,3 mM, KCl 23,6 mM, CaCl₂ 3,6 mM, MgCl₂ 2,1 mM) sendo, em seguida, mantido a 2,5°C.

A qualidade espermática foi mensurada com base na motilidade dos espermatozoides (Yasui *et al.*, 2009, 2012), e apenas amostras apresentando motilidade progressiva acima de 80% foram utilizadas para os ensaios de fertilização. Oócitos foram coletados por meio de extrusão artificial numa placa de Petri de plástico de 100 mm coberta com uma película de plástico. Os oócitos extrusados foram mantidos em solução Dulbecco's - PBS (9,6 g / L). A massa de oócitos foi aliquoteada em cinco partes, sendo a primeira fertilizada imediatamente após a extrusão com 100 µl de sêmen diluído e ativada com adição de 5 mL de água destilada, a segunda após 60 minutos de estocagem, a terceira após 120 minutos de estocagem, a quarta após 180 minutos de estocagem e a quinta após 240 minutos de estocagem, seguindo os mesmos procedimentos de fertilização e sob uma temperatura de estocagem controlada a 26°C.

Análise da estrutura do oócito e do desenvolvimento embrionário

Oócitos mantidos em solução dPBS nos diferentes tempos de estocagem (tratamentos) e embriões durante os estágios de fertilização, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão de todos os tratamentos foram analisados e fotomicrografados em estereomicroscópio Nikon acoplado a equipamento automático de fotomicrografia. Para a análise, foi realizada a descrição e calculada a sobrevivência dos embriões nos estágios de desenvolvimento. Em cada estágio, eram contabilizados e descartados os embriões mortos. Durante a eclosão, as larvas foram classificadas como normais e

anormais de acordo com padrões morfológicos da espécie descritos previamente por Pereira – Santos *et al.* (2016).

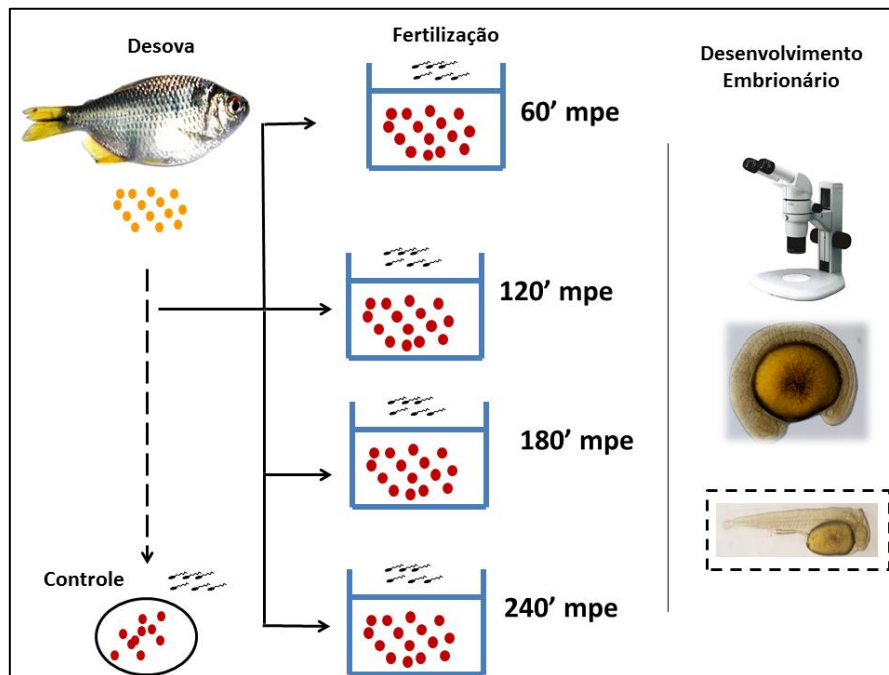


Figura 1: Esquema representativo das fertilizações após os tempos de estocagem dos óócitos de *Astyanax altiparanae* em dPBS.

Larvicultura em sistema laboratorial

Após a abertura da boca (início da alimentação exógena), as larvas foram estocadas em recipientes com volume útil de 1,5 L cada (aquário), dotados de sistema de aeração. Em cada aquário, foi instalado um termostato para manter a temperatura da água a 28°C. As larvas foram alimentadas três vezes ao dia com náuplios de *Artemia*. A eclosão dos náuplios ocorreu diariamente em recipientes de 5 L, utilizando-se uma

salinidade de 0,5%. Antes da última alimentação diária das larvas, era realizada a limpeza dos aquários, com sifonação dos detritos acumulados e renovação de cerca de 75% do volume de água. Neste momento, era observada a ocorrência de mortalidade das larvas. O pH da água foi medido a cada três dias, e a temperatura, diariamente.

Citometria de fluxo

Durante a análise, mediu-se o conteúdo relativo de DNA nuclear dos embriões/larvas para checagem do nível de ploidia (diploide – 2C ou triploide – 3C). Para esta leitura, foram utilizadas 20 embriões/larvas de cada tratamento, incluindo o grupo controle. Quando não foi possível obter 20 indivíduos para a leitura, devido à mortalidade que ocorreu no decorrer dos estágios de desenvolvimento, foi considerado o número total obtido, considerando, porém, um mínimo de três indivíduos.

Amostra da nadadeira dorsal (~ 2 mm²) foi coletada de cada peixe e transferidas para microtubo de 1,5 mL contendo 120 µL de solução de lise. As amostras permaneceram à temperatura ambiente realizando-se agitação em vortex em intervalos de 5 minutos, até perfazer o total de 30 minutos.

Decorrido este tempo, as amostras foram coradas com adição de 800 µL de Dulbecco's PBS (Sigma #D5773) contendo 1 µg mL⁻¹ de corante DAPI e filtradas por meio de peneira de 30 µm (Celltrics, Partec, Germany). As amostras coradas foram então analisadas por citômetro de fluxo Partec CyFlow Ploidy Analyzer (Partec GmbH, Germany) com filtro específico DAPI (358 nm), sendo utilizado um kit comercial

adotado para análises em aquicultura e agricultura (Partec CyStain DNA 2-step, Partec GmbH, Germany).

Esfregação sanguíneo

Esfregaços sanguíneos foram preparados utilizando uma gota de sangue de cada peixe, o qual foi heparinizado numa lâmina de microscópio. As lâminas foram secas à temperatura ambiente durante 6 horas e, em seguida, fixadas em metanol durante 3 segundos. Após 30 minutos de secagem, foram coradas em uma solução baseada em Giemsa (kit rápido Panoptic, fornecido pela LABORCLIN, Pinhais, Brasil) durante 10 segundos, sendo, posteriormente, lavadas em solução dPBS, duas vezes, e secas à temperatura ambiente. Em seguida, as imagens digitais de aproximadamente 50 células foram tiradas num microscópio trinocular (Nikon Ci, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmara CCD (Nikon Ds -F1, Tóquio, Japão), obtendo-se também medidas do diâmetro dos núcleos através do software NIS -Ar Elements (Nikon, Tokyo, Japão).

Estatística

Os dados referentes às taxas de sobrevivência ao longo da embriogênese foram analisados por meio do software Statistica 11.0, sendo apresentados como média \pm DP (desvio padrão). Todos os experimentos foram realizados em quatro repetições, usando diferentes machos e fêmeas para cada repetição. Os dados foram verificados

quanto à normalidade utilizando-se o teste Liliefors, em seguida, comparados usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey (0,05).

Resultados

Análise da estrutura do oócito e do desenvolvimento embrionário

As taxas de sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* utilizando oócitos estocados por 60, 120, 180 e 240 minutos são mostradas na Tabela 1. O desenvolvimento embrionário foi descrito nos estágios de fertilização (zigoto), 2 células, blástula, gástrula, segmentação e eclosão.

Os oócitos após armazenamento em solução de dPBS para fertilização tardia apresentaram padrões morfológicos semelhantes aos observados nos oócitos que foram imediatamente fertilizados após a extrusão (grupo controle) ao longo da primeira hora de estocagem, incluindo integridade de vitelo, ausência de hidratação e corion bem aderido ao oócito sem a formação de espaço perivitelino (Fig. 2).

A partir de 60 mpe, no entanto, foi detectado um aumento do espaço perivitelino, que pode estar relacionado com o aumento do percentual de larvas anormais e eclosão (Tab. 1). Esta hidratação durante o tempo de estocagem não influenciou o percentual de fertilização entre os tratamentos, que não apresentaram diferença significativa entre si e com o grupo controle ($P = 0,92$).

Os embriões do grupo controle mostraram um desenvolvimento muito satisfatório (Figs. 3 A, B, C), porcentagem de eclosão de $93,70 \pm 4,51\%$, sendo $97,16 \pm 0,32\%$ representada por larvas normais (Tab. 1).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento até o estágio de blástula não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (fertilizado imediatamente após a extrusão) em todos os tratamentos ($P = 0,99$).

A análise morfológica do desenvolvimento inicial apresentou um padrão regular de incidência de malformações entre os tratamentos. Os embriões resultantes de oócitos estocados por 60 minutos apresentaram desenvolvimento embrionário regular até os estágios iniciais da blástula sem grande alteração morfológica em comparação com o grupo controle (Figs. 3D, E, F). No estágio de gástrula, no entanto, alterações foram observadas em todas as fases dos movimentos morfogenéticos de epibolia. As células não seguiram um padrão regular de divisão e tiveram reduzidas taxas de sobrevivência nos estágios posteriores. Ainda assim, não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle até à eclosão ($P = 0,99$).

Os oócitos estocados por 120 minutos resultaram em embriões com desenvolvimento anormal (Figs. 3 G, H, I). Os estágios de gástrula e segmentação foram os mais afetados durante a embriogênese. As deformidades observadas durante o estágio de gástrula destacaram um aspecto irregular que frequentemente se estendeu para a região do vitelo (Fig. 3 H).

Durante o estágio de segmentação, os embriões apresentaram anormalidades na coluna vertebral e no desenvolvimento da cauda no período pré-eclosão (Fig. 3 I). O desenvolvimento da região cefálica foi normal, com observação do surgimento das vesículas óptica e ótica. A porcentagem de larvas anormais foi de $30,56 \pm 12,67\%$,

sugerindo uma embriogênese atípica observada nos estágios finais de segmentação, que foram mais evidentes na fase pré-eclosão. Os padrões de movimentos de natação para romper o córion foram afetados como consequência de malformações da cauda.

Os embriões dos oócitos fertilizados após 180 minutos de estocagem (Figs. 3 J, K, L) apresentaram deformidades pronunciadas através dos estágios de 2 células, blástula e eclosão. Durante o estágio de blástula (512 a 1024 células), fase importante para a manipulação e transplante celular, as células apresentaram um padrão de divisão irregular, com células de diâmetros diferentes. As consequências deste padrão foram mais evidentes ao longo das sucessivas divisões, quando os embriões apresentaram diminuição na sobrevivência em relação aos outros tratamentos ($38,39 \pm 15,18\%$).

As principais deformidades observadas nos embriões resultantes foram principalmente um desenvolvimento irregular da região cefálica, e também malformações de cauda e coluna, com grande variação no número de somitos entre embriões que estavam no mesmo estágio de desenvolvimento e distribuição irregular de vitelo. Além disso, observou-se um atraso para atingir cada estágio de desenvolvimento em comparação com o grupo controle, em que a maioria dos embriões apresentou desenvolvimento normal. O tratamento com 180 minutos apresentou a maior porcentagem de larvas anormais ($95,76 \pm 7,35\%$, $P = 0,012$).

Oócitos fertilizados após 240 minutos de estocagem não apresentaram sobrevivência após o estágio de segmentação. As anormalidades foram mais intensas durante o estágio da gástrula (Fig. 3 M, N, O). O vitelo apresentava um padrão irregular de conformação e as divisões celulares eram assíncronas, dando origem a movimentos irregulares de epibola que não avançavam para fases posteriores.

Durante o estágio de gástrula, a sobrevivência decresceu mais de 50,00% em relação ao estágio de blástula ($4,89 \pm 8,47\%$). No estágio de segmentação, houve sobrevivência neste tratamento, as deformidades foram semelhantes às descritas para este estágio nos demais tratamentos, incluindo anormalidades que diminuíram a viabilidade dos embriões até a eclosão. O vitelo apresentou forma irregular e a região cefálica não se desenvolveu de forma sincrônica. A cauda apresentou alto grau de deformidades, representando embriões com lordose e padrão irregular de distribuição de somitos.

Estágio larval

No grupo controle, $97,16\% \pm 0,32\%$ das larvas eclodidas foram normais e apenas $2,84\% \pm 0,32\%$ anormais (Tab. 1; Fig. 4A). O percentual de larvas normais não apresentou diferença significativa entre os tratamentos 60 ($P = 0,90$) e 120 ($P = 0,14$) minutos de estocagem após extrusão. Não houve diferença estatística no tratamento com 180 minutos em relação aos demais tratamentos, no qual a porcentagem de larvas normais caiu para $4,24\% (P = 0,05)$.

Entre as anormalidades observadas ao longo da embriogênese, destacaram - se malformações de cauda com padrão anormal de somitos e dificuldade na natação, resultando em subsequente mortalidade.

Entre as larvas incubadas no tratamento com 60 minutos de estocagem dos oócitos, foi possível destacar pequenas malformações na região de diferenciação da

cauda (Fig. 4B). As regiões da cabeça e do vitelo seguiram padrão normal de desenvolvimento para a espécie.

Com 120 minutos de estocagem dos oócitos para a fertilização, as larvas eclodiram com malformações na região da cauda, comprometendo seus movimentos de natação e conseqüentemente a liberação do córion (Fig. 4C). Algumas larvas também apresentam deformidades na cabeça e padrão irregular de distribuição do vitelo. O tratamento com 180 minutos de estocagem de oócitos apresentou larvas com graves malformações de cauda, cabeça e diferenciação e distribuição do vitelo, refletindo sobre a sobrevivência (Fig 4D). O desenvolvimento foi mais letárgico e apresentou larvas com dificuldade para eclodir devido a malformações. No tratamento de estocagem dos oócitos por 240 minutos, não houve eclosão e sobrevivência.

Análise da ploidia

Os resultados em citometria de fluxo estão descritos na Tabela 1 e pode-se verificar que, no grupo controle, 100% das amostras foram diploides. No tratamento com 60 minutos, $95,56 \pm 4,44\%$ (17/18) das amostras foram diploides e $4,44 \pm 4,44\%$ (1/18) triploides. Em 120 minutos, $94,44 \pm 9,62\%$ (16/17) das amostras foram diploides e $5,56 \pm 5,56\%$ (1/17) triploides. 100% das amostras foram diploides com 180 minutos e aos 240 minutos, não houve sobrevivência. As Figuras 5A e 5B referem-se aos histogramas obtidos por meio do citômetro de fluxo mostrando o padrão diploide (Fig. 5A) e padrão triploide (Fig. 5B) dos indivíduos.

Tabela 1: Sobrevivência e ploidia dos embriões de *Astyanax altiparanae*, cujos oócitos foram imediatamente fertilizados (controle), e nos tratamentos em que foram estocados por 60, 120, 180 e 240 minutos antes da fertilização.

	n° de oócitos	Desenvolvimento Embrionário (%)								Ploidia	
		N. Fert.	Clivagem	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Normal	Anormal	2n	3n
Controle	246	1,44 ± 0,24	98,56 ± 0,24	100,00 ± 0,00	95,69 ± 1,82 ^a	95,14 ± 3,74 ^a	93,70 ± 4,51	97,16 ± 0,32 ^a	2,84 ± 0,32 ^a	50/50	0
60'	94	3,00 ± 0,50	97,00 ± 0,50	97,19 ± 1,52	79,71 ± 0,90 ^a	91,36 ± 3,12 ^a	88,93 ± 5,14	89,95 ± 3,47 ^a	10,05 ± 3,47 ^a	17/18	1/18
120'	119	5,00 ± 1,55	95,00 ± 1,55	84,51 ± 7,49	76,69 ± 9,44 ^a	81,90 ± 6,65 ^a	86,31 ± 6,15	69,44 ± 12,67 ^a	30,56 ± 12,67 ^a	16/17	1/17
180'	126	5,14 ± 1,88	94,86 ± 1,88	87,12 ± 5,35	75,89 ± 6,20 ^a	38,39 ± 15,18 ^b	27,78 ± 48,11	4,24 ± 7,35 ^b	95,76 ± 7,35 ^b	11/11	0
240'	95	7,32 ± 1,73	92,68 ± 1,73	56,50 ± 12,02	4,89 ± 8,47 ^b	16,67 ± 28,87 ^{a,b}	0	0	0	-	-

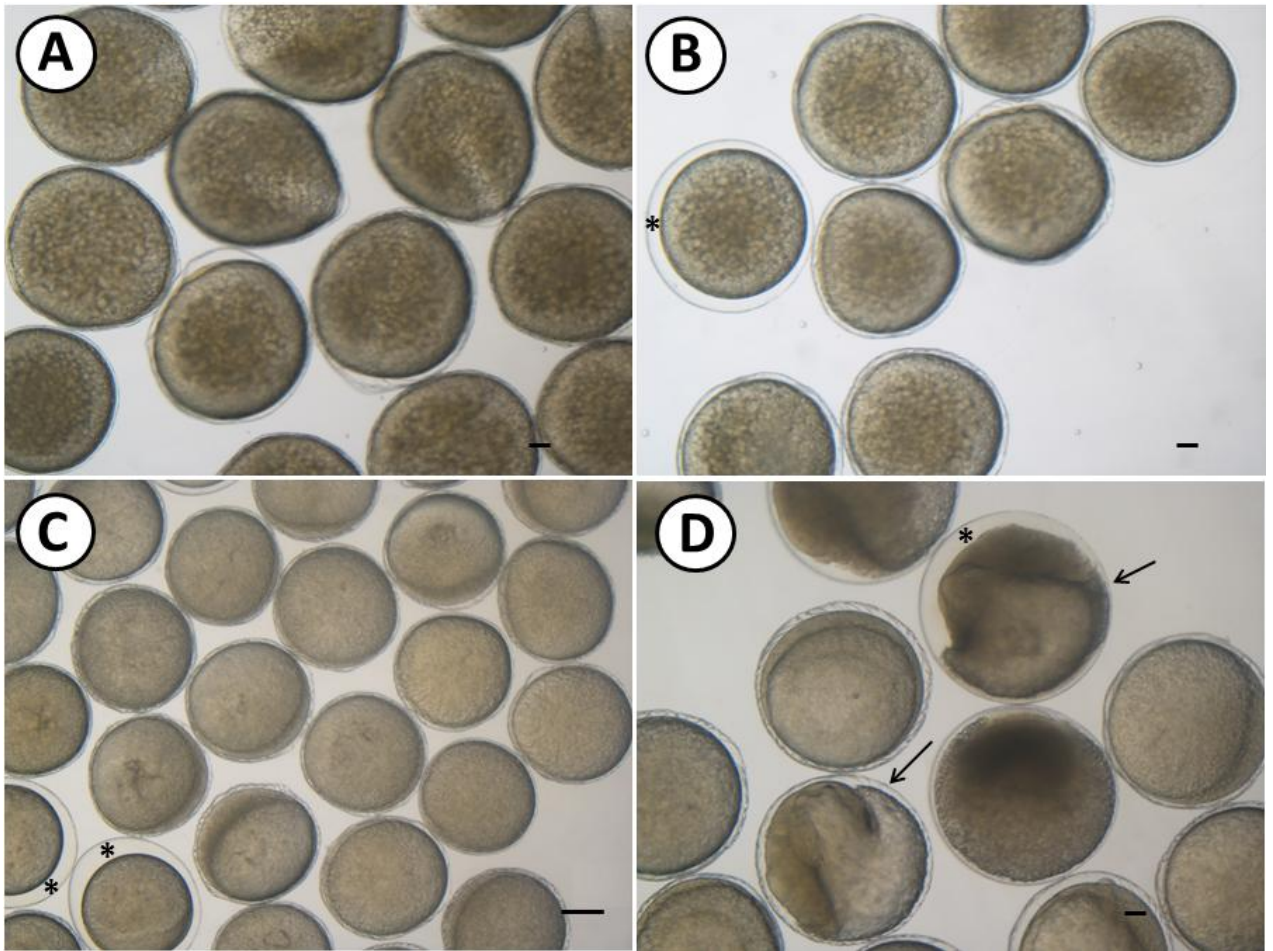


Figura 2: Fotomicrografias representativas de oócitos de *Astyanax altiparanae* estocados por 60 minutos (A), 120 minutos (B), 180 minutos (C) e 240 minutos (D) pós extrusão. Asteriscos indicam oócitos com hidratação parcial ou total durante a estocagem; setas destacam alterações morfológicas na estrutura dos oócitos. Barras de escala: 100 μm .

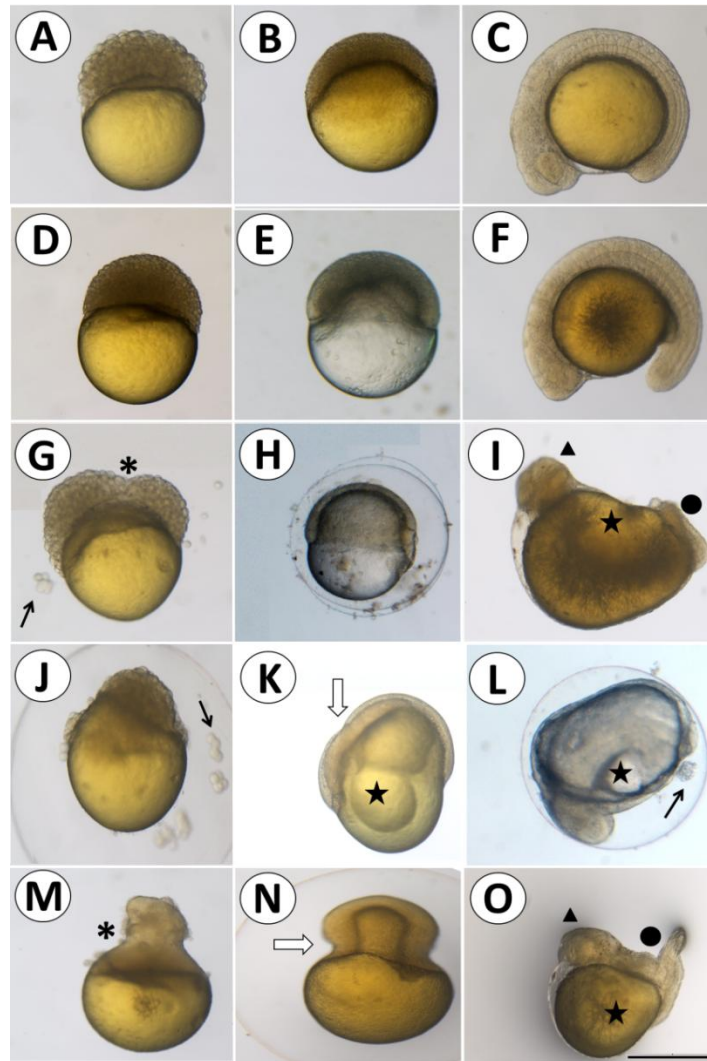


Figura 3: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae*. Oócitos fertilizados imediatamente após a extrusão (controle) nos estágios de blástula, gástrula e segmentação (A, B, C). Embriões cujos oócitos foram fertilizados 60 minutos após a extrusão (D, E, F); 120 minutos após a extrusão (G,H, I); 180 minutos após a extrusão (J, K, L) e 240 minutos após a extrusão (M, N, O). Asteriscos indicam malformações durante as divisões celulares da blastoderme, setas indicam células desprendidas dos embriões, setas brancas indicam malformações durante a gastrulação, estrelas destacam malformações na conformação do vitelo, triângulo indica malformações na região cefálica e círculos representam malformações na região caudal. Barra de escala: 100 μm .

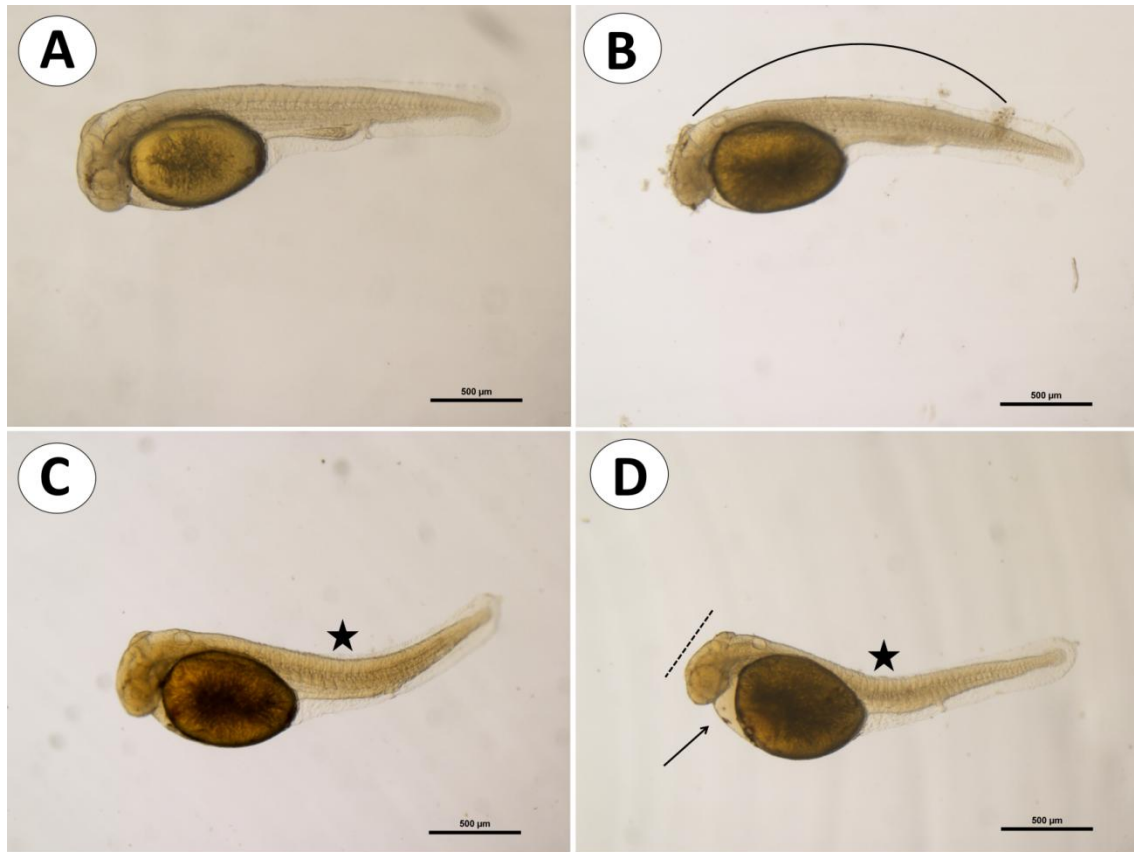


Figura 4: Larvas de *Astyanax altiparanae* provenientes de oócitos fertilizados imediatamente após a extrusão (controle) (A), fertilizados 60 após a extrusão (B), após 120 minutos de estocagem (C) e após 180 minutos de estocagem (D). Linha em curva indica desenvolvimento anormal da região caudal, estrela destaca lordose e escoliose, linha tracejada destaca padrão anormal de diferenciação cefálica e seta destaca pericárdio com edema.

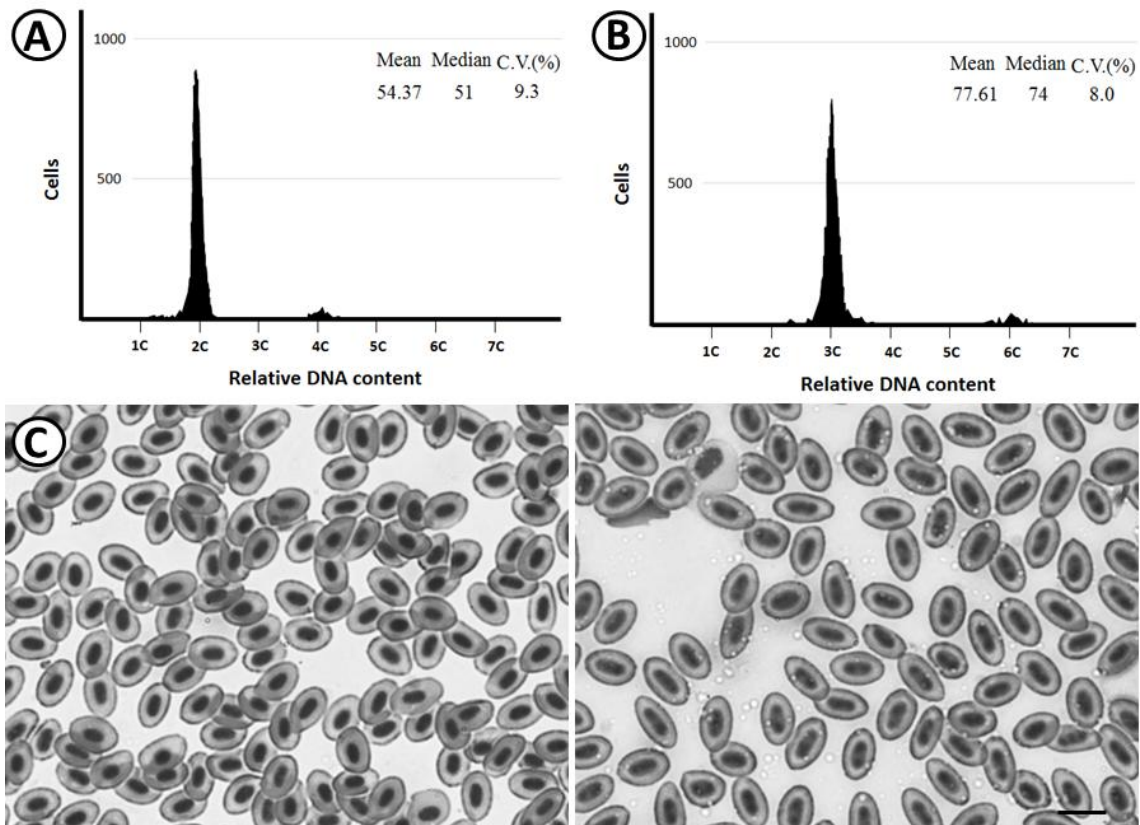


Figura 5: Análise de ploidia destacando indivíduos diploides e triploides na espécie *Astyanax altiparanae*, por meio de citometria de fluxo (A, B) e esfregaço sanguíneo (C, D). Barra de escala: 100 μm .

Discussão

Este estudo fornece informações importantes sobre a estocagem de oócitos e a subsequente fertilização *in vitro*. O tempo de estocagem dos oócitos após a extrusão pode influenciar a morfologia dos embriões, sua viabilidade e sobrevivência, além de afetar diretamente a ploidia dos embriões.

De acordo com Brooks *et al.* (1997), a qualidade do oócito é determinada pelas propriedades intrínsecas do próprio oócito e o ambiente em que o mesmo é fecundado e posteriormente incubado. A maioria dos trabalhos prévios centrou-se na capacidade de fertilização dos oócitos após a extrusão (Yasui *et al.*, 2015), em que os autores concluíram que os oócitos nesta espécie podem ser armazenados apenas poucas horas após amostragem. Assim, a viabilidade do oócito é determinada não só por características externas, incluindo morfologia, cor e outros aspectos, mas outros fatores que são importantes para a sobrevivência e manutenção da embriogênese e, portanto, a capacidade de fertilização.

De uma forma geral, a qualidade dos oócitos pode ser definida como a capacidade em ser fertilizado e, subsequentemente, se desenvolver dentro de um padrão de normalidade para a espécie, possibilitando o desenvolvimento de um embrião até a fase adulta. Na aquicultura, a qualidade destes gametas é muito variável e apresenta-se sob influência de um número significativo de fatores externos e também de aspectos relacionados ao manejo dos reprodutores, além dos moduladores gênicos relacionados à qualidade dos gametas, que são pouco conhecidos (Bobe e Labbé, 2010).

Nas espécies *Curimatella lepidura* e *Steindachnerina elegans*, duas espécies de pequeno porte da família Curimatidae, a taxa de fertilização dos oócitos foi de $74,5 \pm$

7,96% e $71,2 \pm 10,8\%$, respectivamente, sob uma faixa de incubação de 24°C . Assim como observado em *Astyanax altiparanae*, os oócitos apresentaram estrutura morfológica externa com adesividade e canal micropilar em funil (Perini *et al.*, 2013; Pereira – Santos *et al.*, 2016). No presente estudo, sob uma temperatura de incubação de 26°C , a taxa de fertilização dos oócitos em *A. altiparanae* foi muito satisfatória e superior, com $98,56 \pm 0,42\%$, o que evidencia o sucesso reprodutivo da espécie, mesmo em condições de estocagem dos oócitos, onde se observou pouca variação no percentual de fertilização ao longo dos tratamentos. Os reflexos da estocagem dos oócitos foram mais decisivos e evidentes ao longo da embriogênese e na eclosão.

A perda gradativa da viabilidade é constante entre os teleósteos após a ovulação (Rizzo *et al.*, 2003), o que pode ser diretamente relacionado com a queda na sobrevivência ao longo do desenvolvimento embrionário observada neste trabalho. Oócitos de *Prochilodus marginatus* armazenados *ex situ* apresentaram taxas de fertilização inferiores rapidamente após a ovulação, simultaneamente com um aumento no número de larvas deformadas. Rizzo *et al.* (2003) apontam que, diante destes resultados, a estocagem de oócitos *ex situ* para a espécie não deve ultrapassar o tempo de uma hora, sob temperatura controlada a 26°C . Sob as mesmas condições de incubação, o presente trabalho inferiu resultados semelhantes para *Astyanax altiparanae*, cujo aumento do percentual de larvas anormais é visível a partir de uma hora de incubação *ex situ* dos oócitos, aumentando gradativamente até a mortalidade total conforme o aumento deste intervalo (até quatro horas pós extrusão).

As alterações diretas causadas sobre a ploidia de amostras de oócitos fertilizados após determinado tempo de estocagem na espécie *Astyanax altiparanae*, como observado no presente estudo, podem se unir aos fatores que influenciam a viabilidade de uma desova, a qualidade do desenvolvimento embrionário e,

consequentemente, a sobrevivência da progênie, importante para a indústria aquícola e também para o aprimoramento de técnicas de manipulação cromossômica e ensaios em biotecnologia aplicada a reprodução. A indução indireta de indivíduos poliploides devido à queda na qualidade dos oócitos em decorrência do tempo de estocagem pós extrusão pode surtir reflexos diretos sobre etapas posteriores da criação, visto que estes rearranjos cromossômicos podem carrear alterações significativas em importantes fatores relacionados à produção e propagação das espécies. Indivíduos triploides, por extensão, podem ser estéreis e não apresentar desenvolvimento gonadal, além de crescimento somático superior aos diploides da mesma espécie (Piferrer *et al.*, 2009).

Na biotecnologia aplicada, é comum o uso de técnicas para indução de indivíduos poliploides para diversos fins, tais como manipulação cromossômica (Fujimoto *et al.*, 2010), indução de indivíduos triploides através de tetraploides (Zhao *et al.*, 2012), produção de ginogenéticos (Felip *et al.*, 2001) e quimerismo (Yasui *et al.*, 2011). Na execução destes trabalhos, assim como foi constatado pelo presente estudo, fatores como o tempo até que os oócitos sejam fertilizados e que se inicie a aplicação da técnica podem influenciar a ploidia destas progênes e consequentemente, comprometer a eficácia dos protocolos e a interpretação dos resultados.

O envelhecimento do oócito pode ser uma possível explicação para o surgimento de triploides espontâneos em populações naturais em *Astyanax*, como o *Astyanax schubartii* (Morelli *et al.*, 1983), *Astyanax* sp. (Fauaz *et al.*, 1994; Kantek *et al.*, 2007), *A. scabripinnis* (Maistro *et al.*, 1994, Machado *et al.*, 2012). Diferente do que sugere Machado *et al.* (2012) para *Astyanax scabripinnis* e Silva *et al.* (2011) para *Rhandia quellen*, o triploide natural não ocorre especificamente devido às diferenças de temperatura nos rios em áreas de desova. Conforme observado neste estudo, esta ocorrência natural pode ser explicada pelo fato de que uma parcela de oócitos é

extrusada enquanto outra permanece estocada em curto prazo no fluído ovariano, ficando gradativamente maduro, e então posteriormente liberado pelas fêmeas e fertilizado. A ocorrência de indivíduos triploides naturais devido a tais fatores de estocagem e de fertilização tardia também foi relatada por Nomura *et al.* (2013) para *Anguilla japonica*.

Em conclusão, os oócitos de *Astyanax altiparanae* devem ser fertilizados imediatamente após a extrusão, a fim de evitar diminuição da taxa de fertilização, mortalidade durante o desenvolvimento embrionário e também alterações no estado de ploidia. Este estudo é o primeiro relato para espécies neotropicais e é importante para a aplicação de tecnologias em reprodução de peixes e para elucidar o surgimento de poliploides naturais.

Referências Bibliográficas

Bobe, J.; Labbé, C. **Egg and sperm quality in fish.** General and Comparative Endocrinology. 165 (3): 535-548. 2010.

Brooks, S.; Tyler, C. R.; Sumpter, J. P. **Egg quality in fish: what makes a good egg?** Reviews in Fish Biology and Fisheries. 7 (4): 387-416. 1997.

Fauaz, G., Vicente, V. E., Moreira, O. **Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae).** *Revista Brasileira de Genética*, 17(2), 157-163. 1994.

Felip, A.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Piferrer, F. **Induction of triploid and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species.** *Genetica*. 111 (1): 175-195. 2001.

Fujimoto, T.; Yasui, G. S.; Hayakawa, M.; Sakao, S.; Yamaha, E.; Arai, K.

Reproductive capacity of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa from a natural tetraploid male. *Aquaculture (Amsterdam)*, S133-S139, 2010.

Gasparini, C.; Evans, J. P. **Ovarian fluid mediates the temporal decline in sperm viability in a fish with sperm storage.** *PLoS ONE* 8(5): e64431. 2013.

Gold, J. R.; Li, Y. C.; Shipley, N. S.; Powers, P. K. **Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding.** *Journal of Fish Biology*. 37: 563-575. 1990.

Higaki, S.; Eto, Y.; Kawakami, Y.; Yamaha, E.; Kagawa, N.; Kuwayama, M.; Nagano, M.; Katagiri, S.; Takahashi, Y. **Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos.** *Reproduction* 139: 733-740. 2010.

Kantek, D. L. Z., Noleto, R. B., Fenocchio, A. S., Cestari, M. M. **Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguazu River Basin.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 67-74. 2007.

Komen, H.; Thorgaard, G. H. **Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review.** *Aquaculture* 269, 150-173. 2007.

Kusuda, S.; Teranishi, T.; Koide, N.; Nagai, T.; Arai, K.; Yamaha, E. **Pluripotency of cryopreserved blastomeres of the goldfish.** *Journal of Experimental Zoology*. 301: 131-138. 2004.

Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. **Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed.** *General and Comparative Endocrinology*. 166 (3): 367-389. 2010.

Machado, S. N., Neto, M. F., Bakkali, M., Vicari, M. R., Artoni, R. F., Oliveira, C. D., Foresti, F. **Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence.** *Caryologia*, 65(1), 40-46. 2012.

Maistro, E. L., Lúcia Dias, A., Foresti, F., Oliveira, C., Filho, O. M. **Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes.** *Caryologia*, 47(3-4), 233-239. 1994.

Melo, R. M. C.; Ferreira, C. M.; Luz, R. K.; Sato, Y.; Rizzo, E.; Bazzoli, N.

Comparative oocyte morphology and fecundity of five characid species from São Francisco River basin, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*. 27 (6): 1332-1336. 2011.

Molina, W. F. **An alternative method for mitotic simulation in fish cytogenetics.** *Chromosome Science* 5, 149-152. 2001.

Molina, W. F.; Alves, D. E. O.; Araújo, W. C.; Martinez, P. A.; Silva, M. F. M.; Costa, G. W. W.F. **Performance of human immunostimulating agentes in the improvement of fish cytogenetic preparations.** *Genetics and Molecular Research* 9, 1807-1814. 2010.

Morelli, S., Bertollo, L. A. C., Foresti, F., Moreira F., O., De Almeida Toledo F., S.

Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia*, 36(3), 235-244. 1983.

Nomura, K.; Takeda, Y.; Unuma, T.; Morishima, K.; Tanaka, H.; Arai, K.; Ohta, H.

Post ovulatory oocyte aging induces spontaneous occurrence of polyploids and mosaics in artificial fertilization of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. 404-405; 15-21. 2013.

Oehninger, S. **Clinical management of male infertility in assisted reproduction: ICSI and beyond.** International Journal of Andrology. 34:319-329. 2011.

Otani, S.; Iwai, T.; Nakahata, S.; Sakai, C.; Yamashita, M. **Artificial fertilization by Intracytoplasmic Sperm Injection in a teleost fish, the Medaka (*Oryzias latipes*).** Biology Reproduction 80:175-183. 2009.

Pereira-Santos, M.; Yasui, G. S.; Xavier, P. L. P.; Adamov, N. S. M.; Nascimento, N. F.; Fujimoto, T.; Senhorini, J. A.; Nakaghi, L. S. O. **Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae).** Zygote 1-13. 2016.

Perini, V. R.; Sato, Y.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. **Comparative analysis of the oocytes and early development of two species of Curimatidae teleost fish.** Anatomia, Histologia, Embriologia. 42(1): 40-47. 2013.

Piferrer, F.; Beaumont, A.; Falguiere, J. C.; Flajshans, M.; Haffray, P.; Colombo, L. **Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment.** Aquaculture 293, 125-156. 2009.

Rizzo, E.; Godinho, H. P.; Sato, Y. **Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii***. *Theriogenology*. 60(6): 1059-1070. 2003.

Silva M, Matoso DA, Ludwig AM, Gomes E, Almeida MC, Vicari MR and Artoni RF, 2011 -**Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil**. *Environ. Biol. Fishes*, 91: 361–366.

Sun, Y. H.; Chen, S. P.; Wang, Y. P.; Hu, W.; Zhu, Z. Y. **Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) enucleated eggs**. *Biology of Reproduction* 72, 510-515. 2005.

Tanaka, D.; Takahashi, A.; Ueno, K. **Morphometric characteristics and reproductive capacity of nuclear transplants derived from embryonic cells of loach, *Misgurnus anguillicaudatus***. *Journal of Experimental Zoology*. 311A, 11-19. 2009.

Yasui, G. S.; Arias-Rodrigues, L.; Fujimoto, T.; Arai, K. **A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species**. *Animal Reproduction Science* 116, 335-345. 2009.

Yasui, G. S.; Fujimoto, T. ; Sakao, S. ; Yamaha, E. ; Arai, K. **Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres.** Journal of Animal Science 89: 2380-2388, 2011.

Yasui, G. S.; Fujimoto, T.; Arias-Rodriguez, L.; Takagi, Y.; Arai, K. **The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*.** Aquaculture (Amsterdam), v. 344-349, p. 147-152, 2012.

Yasui, G. S.; Senhorini, J. A.; Shimoda, E.; Pereira-Santos, M.; Nakaghi, L. S. O.; Fujimoto, T.; Arias-Rodrigues, L.; Silva, L. A. **Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish.** Animal, 1-7. 2014.

Zhao, Y. ; Psenicka, M. ; Fujimoto, T. ; Saito, T. ; Yasui, G. S. ; Yamaha, E. ; Arai, K. . **Motility, morphology, mitochondria and ATP content of diploid spermatozoa from sex-reversed clonal diploid and neo-tetraploid loach.** Journal of Applied Ichthyology, 28:1006-1012, 2012.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA / ICMBio), pelo fornecimento de toda a estrutura física, fornecimento de material biológico e suporte técnico necessários, ao financiamento da FAPESP (2010/17429-1 e 2011/11664-1), ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), de Jaboticabal/SP, ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal/SP e à Capes, pelo financiamento do projeto de pesquisa em forma de bolsa de doutorado.

Capítulo II

Capítulo II: Inativação do material genético materno por irradiação UV em *Astyanax altiparanae*: Determinação da solução para estocagem de oócitos e da faixa de irradiação

Sumário

Resumo.....	77
Introdução.....	78
Material e Métodos.....	80
Resultados.....	88
Discussão.....	103
Referências Bibliográficas.....	106
Agradecimentos.....	110

Resumo

A androgênese em peixes é um protocolo de manipulação cromossômica baseado em reprodução uniparental a partir do material genético paterno. A técnica pode ser utilizada como ferramenta de preservação de espécies ameaçadas em peixes. Para isso, é necessário o estabelecimento de uma solução para estocagem dos oócitos para posteriores manipulações, mantendo sua viabilidade em ser fertilizado; e de uma faixa ideal de irradiação UV que inative completamente o material genético materno. O objetivo deste estudo foi estabelecer esses conhecimentos com a espécie *Astyanax altiparanae*. Para determinar a solução ótima, foram testadas três composições para manutenção por quatro faixas de tempo: Ringer, dPBS e Hanks, por 30, 60, 90 e 120 minutos, totalizando treze tratamentos com controle, fertilizados após o tempo de extrusão. Na determinação da faixa de irradiação UV, os oócitos foram irradiados com doses de 30, 60, 90, 120 e 150 mW/cm², em câmara de irradiação UV, e posteriormente fertilizados. A ploidia foi avaliada por citometria de fluxo. A solução ideal para estocagem dos oócitos pós extrusão foi a de dPBS, por até 120 minutos, permitindo um largo intervalo para manipulação. Nesse tratamento, a taxa de eclosão foi de 92,08 ± 1,75%. A faixa de irradiação mais eficaz em inativar o material genético materno foi a de 90 mW/cm², com 100% das amostras analisadas haploides. A sobrevivência nessa faixa também foi viável, com 87,01 ± 6,58% de eclosão. O estabelecimento destes protocolos permite o avanço em estudos inéditos com androgênese em espécies nativas, além de atuarem como protocolos de base para estudos em biotecnologia aplicada.

Palavras-chave: Biotecnologia, manipulação cromossômica, citometria de fluxo, peixes.

Introdução

Androgênese pode ser definida como um protocolo de manipulação cromossômica baseado em reprodução uniparental, em que apenas o material genético paterno é transmitido e o núcleo materno é inativado, geralmente por irradiação. Desta forma, a progênie passa a ser haploide, sendo necessárias outras manipulações para restaurar o seu estado diploide (Morishima *et al.*, 2011).

Este protocolo de biotecnologia aplicada representa importante ferramenta para propagação e recuperação de espécies ameaçadas em peixes, modelos biológicos que permitem tais manipulações. Em espécies seriamente ameaçadas, por exemplo, a androgênese pode atuar como técnica de propagação mediada, através da fertilização com espermatozoides criopreservados e oócitos irradiados de espécies filogeneticamente próximas (Lin e Dabrowski, 1998; Fujimoto *et al.*, 2007).

A manipulação cromossômica baseada em reprodução uniparental já vem sendo bem estabelecida através de androgênese e ginogênese para espécies em que o conhecimento da biologia reprodutiva e da embriogênese já são bem consolidados. Na literatura indexada já existem protocolos bem estabelecidos para aplicação destas

técnicas, viabilizados pelo conhecimento detalhado da biologia básica das espécies (Lin e Dabowski, 1998; Paschos *et al.*, 2001; Yoshikawa *et al.*, 2008). Contudo, são inexistentes os estudos nessa área com as espécies nativas, e a viabilidade de aplicação da técnica é estritamente espécie-específico.

No caso da indução à androgênese, entre as principais etapas para consolidação efetiva da técnica, é imprescindível um conhecimento detalhado da morfologia do oócito, dos aspectos relacionados à sua morfologia e dos eventos pré e pós – fertilização. Essas informações são necessárias para que seja possível a inativação completa do material genético materno, mantendo ainda a sua viabilidade em ser fertilizado e desenvolver (Arai *et al.*, 1992).

Esta etapa é imprescindível para o sucesso da técnica de androgênese, tendo em vista que fragmentos cromossômicos derivados do genoma materno na progênie androgenética devido a uma incompleta faixa de irradiação UV podem acarretar anormalidades no embrião e comprometer a viabilidade e a sobrevivência das progênies (Ocalewicz *et al.*, 2009). Dessa forma, o estabelecimento de uma faixa ideal de irradiação UV dos oócitos e também das condições ideais de manutenção dos mesmos durante o processo de manipulação são duas etapas imprescindíveis para o sucesso da técnica e que devem ser estabelecidos para cada espécie.

Para que isso seja possível, é necessário atender alguns requisitos básicos para manutenção dos oócitos após a extrusão. A irradiação deve, ao mesmo tempo, ser eficaz na inativação do material genético materno e manter a viabilidade do oócito irradiado ainda não fertilizado. Para tanto, o meio de irradiação deve apresentar baixa viscosidade e toxicidade para os gametas. Soluções sintéticas são as mais recomendadas, já que

soluções naturais, como plasma seminal ou fluido do ovário, podem mostrar diferentes concentrações devido à variação sazonal, e não são prontamente disponíveis em todo o ano (Yasui *et al.*, 2009; 2010).

Diante da importância em inativar totalmente o material genético materno durante o processo de irradiação, são fundamentais as ferramentas de confirmação desta etapa. A análise cromossômica e a citometria de fluxo são métodos de análise muito importantes para averiguar o conteúdo do DNA nas progênies e consequentemente confirmar o sucesso da indução à androgênese (Lin e Dabrowski, 1998).

O trabalho foi conduzido com o objetivo de estabelecer um protocolo de manipulação otimizado para inativação completa do material genético materno para indução à androgênese na espécie de caracídeo *Astyanax altiparanae*, um interesse modelo de manipulação cromossômica para espécies nativas neotropicais, baseado na necessidade de um protocolo para estabelecer a solução ideal para o processo de estocagem do oócito e da faixa ideal de irradiação UV.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no uso de Animais do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEUA / CEPTA # 02031.000007/2016- 65).

Etapa I - Determinação de solução para estocagem dos oócitos*Coleta dos Gametas*

A Figura 1 esquematiza as principais metodologias realizadas nesta etapa dos experimentos. Foram utilizadas fêmeas maduras da mesma idade da espécie *Astyanax altiparanae* (aproximadamente cinco meses de idade, com 9 cm de comprimento), morfológicamente aptas para a reprodução através de características como abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada e tamanho e coloração uniformes dos oócitos. Após esta seleção prévia, os animais foram transferidos para ambientes de temperatura controlada (28°C) e receberam tratamento hormonal para indução a reprodução, com hormônio sintético Ovopel® (D-Ala, Pro-Net-mGnRH) (Unic-trade, Hungria), na concentração de 3mg kg⁻¹, em dose única. Após aproximadamente seis horas, os animais foram transferidos para solução anestésica de mentol para os procedimentos de extrusão artificial e coleta dos oócitos, que foram transferidos para placa de Petri de plástico de 100 mm coberta com uma película de plástico, em ambiente de temperatura controlada a 26°C (ver Pereira – Santos *et al.*, 2016).

O sêmen foi coletado de machos maduros, da mesma idade das fêmeas utilizadas, após tratamento com o mesmo protocolo de indução hormonal. Com cerca de seis horas de ação do hormônio, os mesmos foram separados das fêmeas e transferidos para solução anestésica de mentol para o procedimento de coleta. O sêmen foi coletado

utilizando uma micropipeta de 1000 μ L Eppendorf (Eppendorf, Alemanha) e imediatamente transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 400 μ l de solução de Ringer modificado (NaCl 128,3 mM, KCl 23,6 mM, CaCl₂ 3,6 mM, MgCl₂ 2,1 mM) sendo, em seguida, mantido a 2,5°C. A qualidade espermática foi mensurada com base na motilidade dos espermatozoides (ver Yasui *et al.*, 2009, 2012), e apenas amostras apresentando motilidade progressiva acima de 80% foram utilizadas para os ensaios de fertilização.

Soluções e intervalos de estocagem

Foram utilizados três diferentes meios de soluções:

1- Solução de Ringer (7,5 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl₂) contendo 0,5% de BSA (*Bovine serum albumin* - albumina do soro bovino);

2- Solução de Hank's – HBSS (137mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 1,3 mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 4,2 mM NaHCO₃) contendo 0,5% de BSA;

3- Solução de DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma #D5773) (9,6g/L), contendo 0,5% de BSA.

Cada solução recebeu uma alíquota de oócitos, que eram fertilizados com a mesma amostra de sêmen após 30, 60, 90 e 120 minutos pós extrusão com 10 µL de sêmen. Uma das alíquotas foi fertilizada imediatamente após a extrusão e mantida em água com temperatura ambiente (26°C), atuando como um controle para os tratamentos. Os parâmetros de integridade do oócito avaliados foram ocorrência de hidratação dos mesmos nas diferentes soluções, os índices de fertilização após os intervalos testados, e os percentuais de sobrevivência ao longo do desenvolvimento embrionário.

Análise do Desenvolvimento Embrionário

O experimento foi realizado em triplicata. Os embriões (aproximadamente 232 embriões para cada tratamento) foram mantidos sob temperatura controlada a 26°C e incubados em sistema de acordo com o descrito em Pereira – Santos *et al.* (2016) para a espécie *Astyanax altiparanae*. Os treze tratamentos – controle, dPBS 30, 60, 90 e 120, Hanks 30, 60, 90 e 120 e Ringer 30, 60, 90 e 120 – tiveram sua embriogênese descrita e a sobrevivência analisada durante os estágios de fertilização, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão. Durante a eclosão, as larvas foram classificadas como normais e anormais de acordo com padrões morfológicos da espécie descritos previamente por Pereira – Santos *et al.* (2016). A embriogênese foi descrita sob

estereomicroscópio Nikon SMZ 1500 (Nikon, Tokyo, Japão), acoplado ao equipamento automático de fotomicrografia CCD (Nikon SMZ 1500, Nikon, Tokyo, Japão).

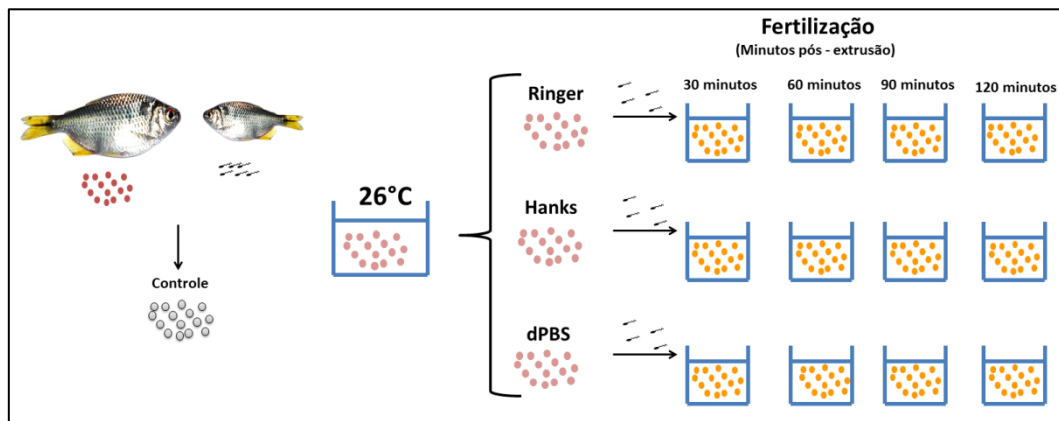


Figura 1: Metodologia de estocagem e fertilização dos oócitos.

Etapa II - Faixa de Irradiação UV

Os procedimentos de indução e coleta dos gametas foram os mesmos descritos na Etapa I. Esta etapa também foi realizada em triplicata.

Irradiação dos oócitos de *Astyanax altiparanae* em câmara UV

A Figura 2 esquematiza as etapas subsequentes para determinação da dose ótima de irradiação UV para inativação do material genético dos oócitos da espécie *Astyanax altiparanae*. Uma alíquota de oócitos (aproximadamente 130 oócitos) foi

depositada em placa de Petri (135 mm de diâmetro), juntamente com 8,0 mL da solução com os melhores resultados em manutenção da morfologia e hidratação observadas na primeira etapa. Os oócitos foram irradiados em câmara UV conforme descrito por Fujimoto (2007) nas doses de 30, 60, 90, 120 e 150 mW/cm².

As alíquotas de oócitos (cerca de 130 oócitos) das diferentes doses de irradiação foram fertilizadas com aproximadamente 18 µL de sêmen fresco de *Astyanax altiparanae* e os gametas ativados com a adição de 20 mL de água do tanque, sendo os ovos incubados em placas de Petri à temperatura ambiente de 26,0°C (temperatura controlada). Como controle, uma alíquota de cerca de 100 oócitos intactos da mesma desova utilizada na irradiação também foi fertilizada com 18 µL de sêmen fresco de *Astyanax altiparanae*, os gametas ativados com a adição de 20 mL de água do tanque e os ovos incubados em placas de Petri sob as mesmas condições mantidas nos tratamentos de irradiação. Trocas parciais de água foram realizadas periodicamente no decorrer do período de incubação nas placas de Petri.

Análise do Desenvolvimento Embrionário

O desenvolvimento embrionário foi acompanhado por meio de estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japão) e imagens digitais tomadas através de uma câmera CCD (Nikon DS-F1, Nikon, Tokyo, Japan) empregando-se o software Nis-Ar Elements (Nikon, Tokyo, Japan).

Foram descritos e observados os estágios de duas células, blástula, gástrula, segmentação e eclosão, sendo possível averiguar a “Síndrome Haploide” dos embriões

caracterizada por diversas anormalidades. Para a aferição da taxa de fertilização foram contabilizados os embriões vivos e mortos. A taxa de eclosão também foi mensurada verificando-se a porcentagem de larvas normais e anormais (ver Pereira-Santos *et al.*, 2016).

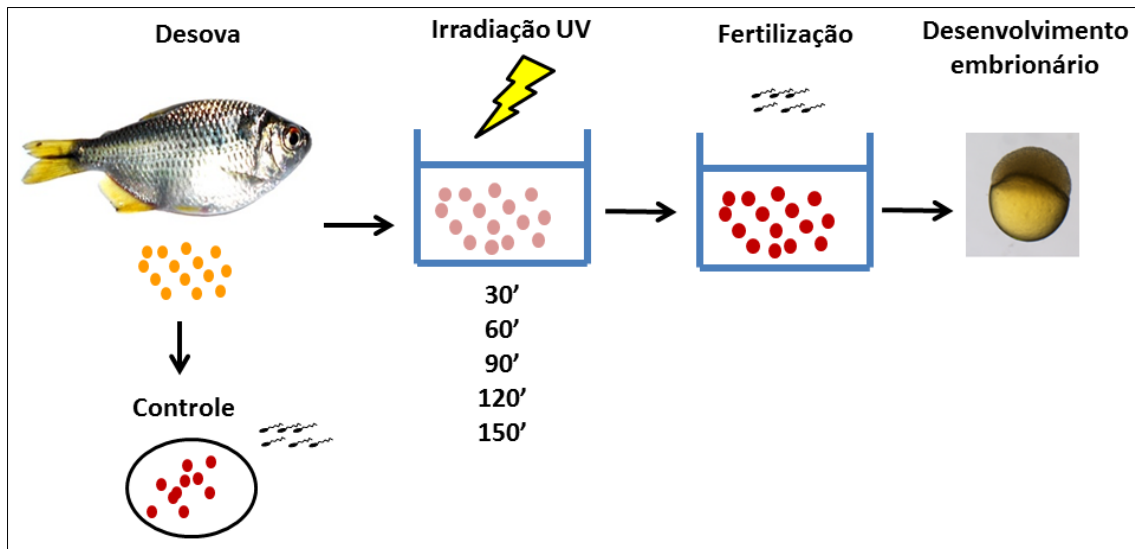


Figura 2: Metodologia de irradiação e fertilização dos oócitos.

Citometria de fluxo

As larvas recém eclodidas foram transferidas para microtubo de 1,5 mL contendo 120 μL de solução de lise. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação em vortex por intervalos de 5 minutos e coradas com adição de 800 μL de Dulbecco's PBS (Sigma #D5773) contendo 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de corante DAPI. As amostras foram então filtradas por peneira de 30 μm (Celltrics, Partec, Germany) e analisadas por citômetro de fluxo Partec CyFlow Ploidy Analyzer (Partec GmbH, Alemanha) com filtro específico DAPI (358 nm). Foi utilizado um kit

comercial adotado para análises em aquicultura e agricultura (Partec CyStain DNA 2-step, Partec GmbH, Alemanha).

Oberservação dos pronúcleos dos oócitos após irradiação UV

Para observação e descrição da fusão dos pronúcleos, os ovos foram analisados sob microscópio de fluorescência, no Laboratório de Biotecnologia de Peixes do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Cepta/ICMBio, em Pirassununga, após o estabelecimento da faixa ideal de irradiação pela citometria de fluxo.

Embriões correspondentes a 0 a 14 minutos pós-fertilização foram corados com 5 µg de corante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindone dihidroclorido (DAPI, SIGMA D9542) + solução dPBS 200x ml⁻¹ (0,000005 g mL⁻¹), diluídos, analisados e fotomicrografados em microscópio de fluorescência (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japão), acoplado a câmera CCD (Nikon DS-F1, Nikon, Toktyo, Japan), com filtro de comprimento de onda de 254 nm. Os embriões foram posicionados com o pólo animal voltado para o plano de observação.

Para avaliar se a irradiação afetou o tempo de fusão dos pronúcleos da espécie, os dados foram comparados com os resultados da análise realizada por Pereira-Santos *et al.* (2016) em embriões não irradiados da espécie *Astyanax altiparanae*.

Estatística

Os dados são apresentados como média \pm EP (erro padrão). Todos os experimentos foram realizados em três repetições, usando diferentes fontes de oócitos. Os dados foram verificados quanto à normalidade utilizando o teste Liliefors, em seguida, comparados usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey (0,05). O software Statistica 11 foi utilizado para a análise estatística.

Resultados

Determinação de solução para estocagem dos oócitos – Etapa I

Os oócitos da espécie *Astyanax altiparanae* apresentam morfologia e estrutura uniformes, com coloração homogênea que pode apresentar variações de acordo com a desova e as condições ambientais onde as fêmeas se encontram. O córion está bem aderido à superfície do oócito, que apresenta adesividade.

Os oócitos recém extrusados de forma artificial apresentaram morfologia íntegra, sem sobreposição de células ou de camadas de células em diferentes níveis de divisão (Fig. 3A). Além disso, não apresentou hidratação no fluido ovariano, característica essencial para o sucesso da fertilização.

Esses aspectos, observados no grupo controle de oócitos recém extrusados e posteriormente fertilizados sem tempo de estocagem, foram os parâmetros de qualidade

considerados na avaliação da qualidade das soluções em estocar e manter a integridade dos oócitos nos diferentes tratamentos, para posterior fertilização.

Os tratamentos com dPBS nos tempos de 30 e 60 minutos pós extrusão (mpe) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle ($P = 0,14$), mantendo características e aspectos morfológicos semelhantes aos dos oócitos recém fertilizados. Os gametas estocados ao longo desse intervalo de tempo na solução não apresentaram hidratação, além de morfologia externa uniforme, sem sobreposição de camadas ou anormalidades. Apresentava de uma forma geral, o mesmo aspecto do grupo controle recém extrusado.

Entre os oócitos estocados por 30, 60, 90 e 120 minutos pós extrusão em solução de Hanks, foi possível destacar algumas alterações morfológicas que causaram consequentes influências sobre a incubação pós fertilização. Os oócitos apresentavam ligeira a moderada hidratação, com grupos apresentando morfologia externa alterada por sobreposição de camadas de células, chegando a se soltar do oócito. Devido a tais alterações os oócitos estocados em solução de Hanks aparentavam estar em estágios diferentes de maturação, mesmo sendo provenientes da mesma desova utilizada nos demais tratamentos.

Tais aspectos foram observados com maior incidência de acordo com o aumento do intervalo de incubação, sendo mais visíveis a partir dos 90 minutos pós extrusão. Entre as características negativas da estocagem pelas soluções, a hidratação observada nesses tratamentos é um dos comportamentos que podem refletir mais negativamente sobre a posterior fertilização, principalmente entre aqueles fertilizados após intervalo maior de estocagem (Fig. 3).

Considerando todos os parâmetros morfológicos relacionados à integridade e viabilidade dos oócitos pós extrusão como indicativos de qualidade, os tratamentos estocados em solução de Ringer foram os que apresentaram maior índice de anormalidades. Ainda com 30 minutos de incubação, a solução não foi eficaz em evitar a hidratação dos gametas, que já passaram a apresentar espaço perivitelino.

Com o avançar do tempo de incubação, gradativamente os oócitos passaram a apresentar alterações em sua morfologia, chegando a aparentar divisões celulares pós fertilização, como estágios de blástula ou gástrula (Figs 3 C, D). Essas alterações, aliadas a constante hidratação dos oócitos, refletiram muito sobre a fertilização e consequente sobrevivência posteriores.

Desenvolvimento pós fertilização – Etapa I

Os resultados de sobrevivência ao longo dos estágios de desenvolvimento embrionário nos diferentes tratamentos são apresentados na Tabela 1. Os oócitos estocados em solução de dPBS apresentaram os maiores índices de fertilização em todos os tempos de incubação, sendo os mais próximos ao observado no grupo controle (Figs 4 A-F). Os oócitos fertilizados após 120 minutos de estocagem em solução de Ringer apresentaram diferença estatística em relação aos demais tratamentos ($P = 0,99$), com $65,88 \pm 15,49$ % de fertilização.

Os estágios mais críticos de incubação foram os de gástrula, segmentação e eclosão, refletindo diretamente sobre a sobrevivência e morfologia das larvas. Nesses momentos, os resultados mais promissores de viabilidade e sobrevivência foram

observados entre os embriões cujos oócitos estavam estocados em solução de dPBS. Todos os intervalos observados durante a estocagem nessa solução não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle ($P = 0,90$).

Apesar de aumentar gradativamente de acordo com o avanço no período de incubação, o percentual de eclosão de larvas anormais observado nos tratamentos com solução de dPBS não apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle ($P = 0,14$), apontando para a viabilidade de aplicação como solução de manutenção.

Os embriões cujos oócitos foram estocados em solução de Hanks apresentaram diferenças significativas em relação ao controle nos estágios de blástula, gástrula, segmentação, eclosão e, posteriormente, nos índices de larvas normais e anormais ($P = 0,05$). Nos tratamentos com 90 e 120 minutos de incubação dos oócitos, os embriões apresentaram sobrevivência significativamente inferior nas fases do estágio de blástula ($P = 0,05$) e, a partir desse momento, em todos os estágios em comparação ao controle.

O percentual de sobrevivência caiu consideravelmente a partir do estágio de gástrula em todos os intervalos de incubação nesta solução. Nos tratamentos de 60, 90 e 120 minutos pós extrusão, a sobrevivência foi, respectivamente, de apenas $0,79 \pm 0,79$, $9,85 \pm 9,85$ e $2,74 \pm 2,11\%$. A partir do estágio de segmentação, foi significativamente inferior ao observado no grupo controle, em todos os intervalos de incubação em dPBS e no próprio intervalo de 30 minutos em Hanks ($P = 0,05$).

No tratamento com solução de Ringer como meio de estocagem pré-fertilização, os resultados foram significativamente discrepantes do observado no grupo controle ($P = 0,012$). Os embriões cujos oócitos foram fertilizados após mais de 30

minutos de estocagem não apresentaram sobrevivência até a eclosão, com grande mortalidade a partir do estágio de gástrula.

Os índices de sobrevivência observados ao longo do período de incubação neste tratamento não foram satisfatórios para posterior incubação e manipulação cromossômica, principalmente devido às anormalidades observadas ao longo da embriogênese (Fig. 4). No tratamento com oócitos incubados por 30 mpe, único que apresentou eclosão, 100% das larvas eram anormais e apresentavam deformidades que inviabilizariam sua sobrevivência posterior.

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram estocados em soluções de dPBS, Hanks e Ringer por 30, 60, 90 e 120 minutos após a extrusão artificial.

	N° de ovos	Estágios do Desenvolvimento (%)							
		Não Fert.	Clivagem	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Normais	Anormais
Controle	263	1,62 ± 0,13 ^a	98,38 ± 0,13 ^a	97,53 ± 0,83 ^a	88,54 ± 7,29 ^a	86,11 ± 8,68 ^a	95,40 ± 2,86 ^a	97,39 ± 0,55 ^a	2,60 ± 0,55 ^a
dPBS 30'	260	3,46 ± 1,63	96,54 ± 1,63	93,55 ± 2,21	83,63 ± 0,78	79,17 ± 2,51 ^a	93,98 ± 2,13 ^a	93,26 ± 1,02 ^a	6,74 ± 1,02 ^a
dPBS 60'	204	2,82 ± 0,36	97,18 ± 0,36	92,52 ± 1,15	77,07 ± 3,15 ^a	72,91 ± 4,34 ^a	82,79 ± 11,23 ^a	88,94 ± 3,22 ^a	11,06 ± 3,22 ^a
dPBS 90'	206	4,51 ± 0,25	95,49 ± 0,25	90,42 ± 1,35	62,73 ± 12,67 ^a	48,93 ± 12,74 ^b	97,18 ± 2,06 ^a	88,12 ± 4,07 ^a	11,88 ± 4,07 ^a
dPBS 120'	237	3,91 ± 1,56	96,06 ± 1,56	82,81 ± 7,26	69,25 ± 13,36 ^a	55,76 ± 8,33 ^b	92,08 ± 1,75 ^a	80,90 ± 9,39 ^a	19,10 ± 9,39 ^a
Hanks 30'	205	8,73 ± 2,32	91,27 ± 2,32	72,96 ± 4,21	26,56 ± 21,27 ^b	20,55 ± 18,50 ^b	56,67 ± 28,48 ^b	47,78 ± 26,97 ^b	52,22 ± 26,97 ^b
Hanks 60'	214	9,25 ± 4,17	90,75 ± 4,17	65,24 ± 9,33	0,79 ± 0,79 ^b	0,26 ± 0,26 ^c	33,32 ± 33,32 ^b	33,33 ± 33,33 ^b	66,67 ± 33,33 ^b
Hanks 90'	207	19,01 ± 10,85	80,99 ± 10,85	38,28 ± 25,49 ^b	9,85 ± 9,85 ^b	7,58 ± 7,58 ^c	16,67 ± 16,67 ^b	0	100 ^b
Hanks 120'	224	17,29 ± 8,85	82,71 ± 8,85	24,55 ± 9,76 ^b	2,74 ± 2,11 ^b	0,77 ± 0,77 ^c	16,67 ± 16,67 ^b	0	100 ^b
Ringer 30'	227	7,95 ± 4,38	92,05 ± 4,38	77,48 ± 10,41	1,33 ± 0,85 ^b	0,39 ± 0,39 ^c	16,67 ± 16,67 ^b	0	100 ^b
Ringer 60'	249	4,67 ± 0,60	95,33 ± 0,60	73,08 ± 14,85	1,45 ± 1,45 ^b	0	0	0	0
Ringer 90'	261	5,26 ± 1,16	94,74 ± 1,16	66,58 ± 23,19	0,44 ± 0,44 ^b	0	0	0	0
Ringer 120'	255	34,12 ± 15,49 ^b	65,88 ± 15,49 ^b	9,23 ± 5,35 ^b	0	0	0	0	0

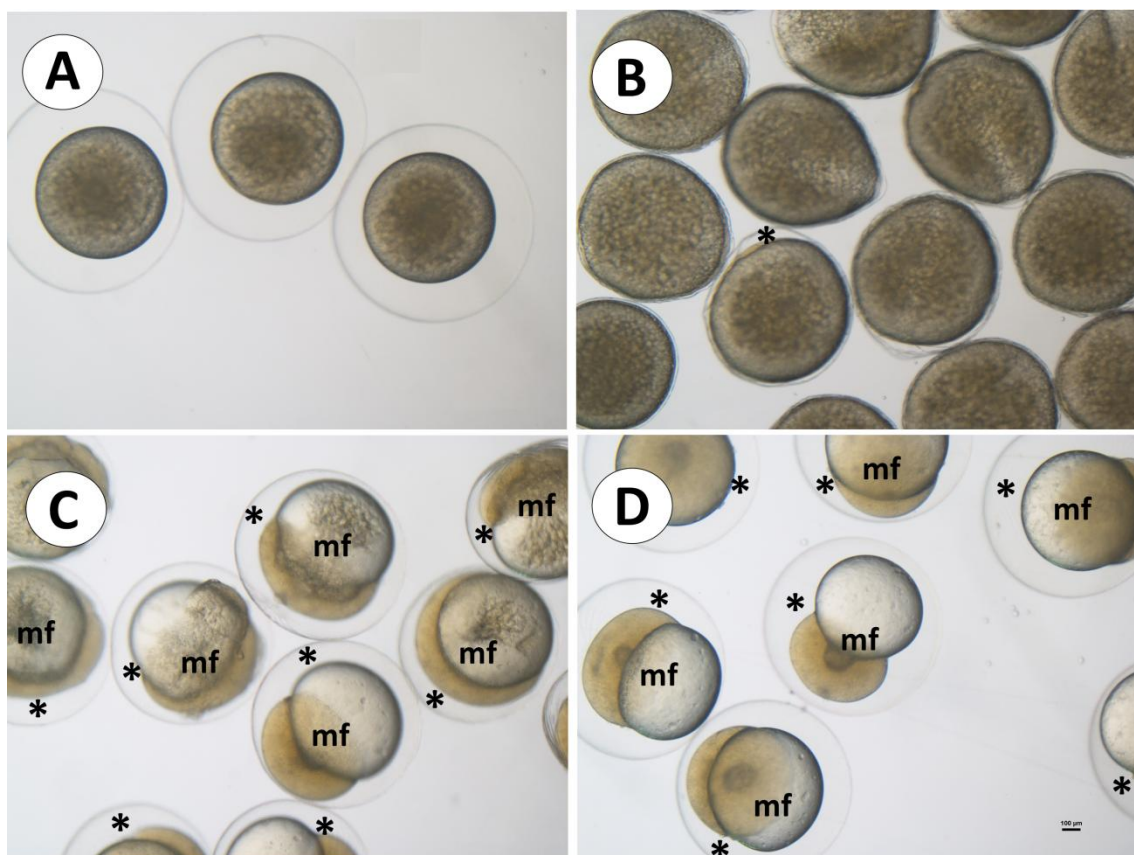


Figura 3: Oócitos da espécie *Astyanax altiparanae* recém fertilizados após a extrusão (A) e estocados em solução de dPBS (B), Hanks (C) e Ringer (D) por 120 minutos após a extrusão, para posterior fertilização. MF: Mal formação. Barra de escala: 100 µm.

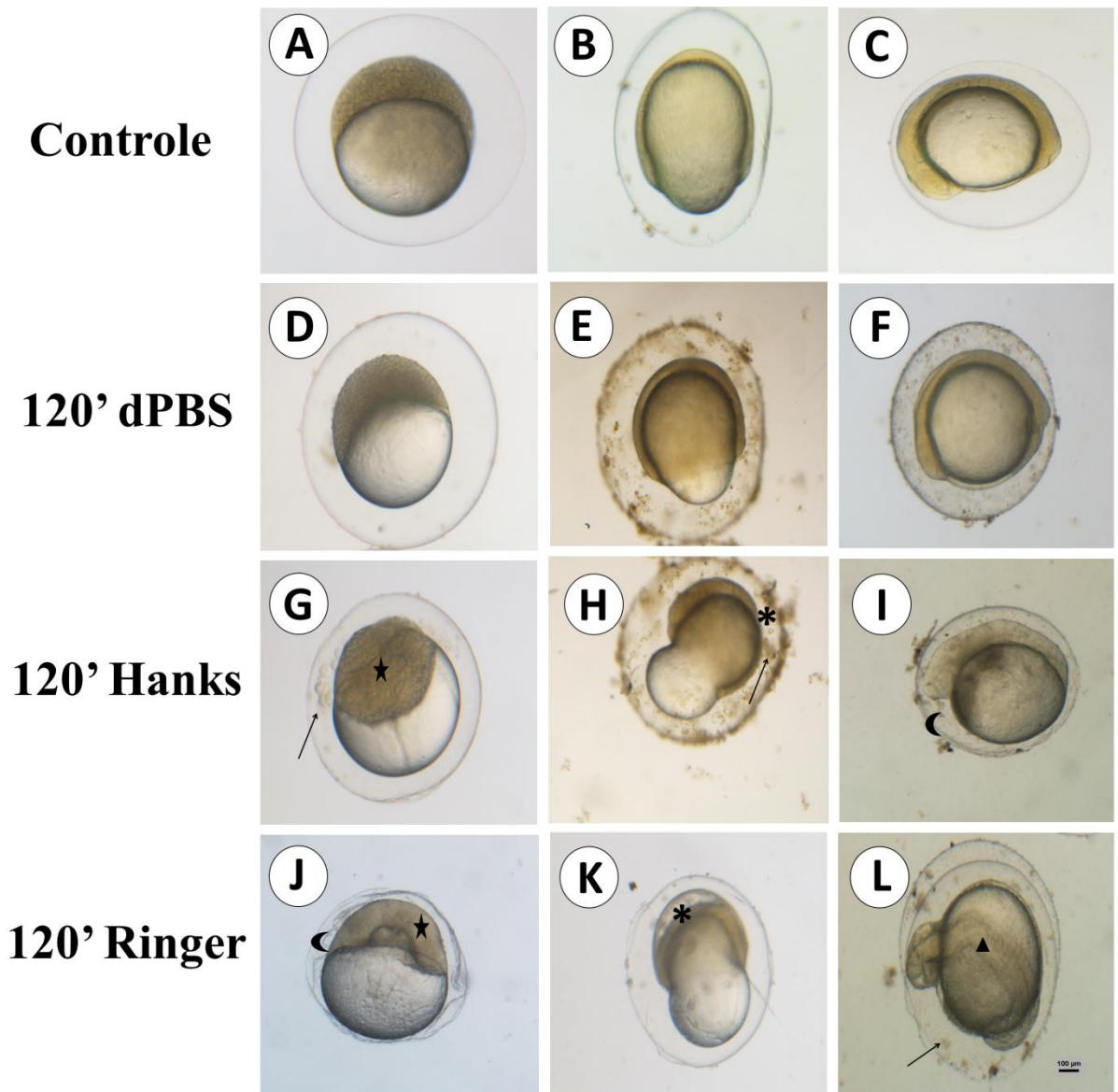


Figura 4: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, cujos oócitos foram fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C) e cujos oócitos foram fertilizados após 120 minutos de extrusão em três soluções: dPBS (D, E, F), Hanks (G, H, I) e Ringer (J, K, L). Setas indicam células que se desprenderam dos embriões. Asteriscos destacam malformações durante os movimentos de epibolia. Meia lua aponta ausência de espaço perivitelino. Estrelas destacam malformações na blastoderme e o triângulo indica malformação de coluna. Barra de escala: 100 µm.

Faixa de Irradiação UV – Etapa II

A partir dos resultados obtidos com a etapa I, foi possível estabelecer a solução ideal para estocagem e as faixas de irradiação UV dos oócitos da espécie *Astyanax altiparanae*. Dessa forma, todos os tratamentos foram irradiados com oócitos diluídos em solução de dPBS.

Os resultados observados nos seis tratamentos de intervalos de irradiação são apresentados na Tabela 2. As anormalidades observadas ao longo da embriogênese apresentaram maior frequência de incidência de acordo com a faixa testada. O tratamento de irradiação com 30', no entanto, não apresentou malformações acentuadas em relação ao controle (Figs. 5 A-D).

Com 60', as malformações mais observadas ocorreram nos estágios de blástula e segmentação (Fig. 5E). No estágio de blástula, os embriões apresentavam blastoderme com divisões celulares assíncronas, destacando-se regiões com células mortas que provocavam deformidades acentuadas. No estágio de segmentação, problemas na formação da coluna foram os mais destacados. Apesar das malformações morfológicas, no entanto, não houve diferença significativa nesses estágios com relação ao grupo controle ($P = 0,83$).

Os embriões cujos oócitos foram irradiados com 90' de UV apresentaram índices satisfatórios de sobrevivência ao longo da embriogênese. As malformações mais evidentes foram observadas nos estágios de clivagem, blástula e segmentação (Fig. 5G). No entanto, a sobrevivência não foi afetada nesse período, sendo de $82,58 \pm 12,90$, $62,36 \pm 27,11$ e $74,56 \pm 5,89\%$, respectivamente.

As malformações mais frequentes nesse período foram observadas nas divisões celulares da clivagem, com pouca sincronia e disformidade de tamanho, nas divisões celulares da blástula e também na diferenciação dos primeiros somitos no estágio de segmentação. Nessa faixa, 100% das larvas eclodidas foram classificadas como anormais, apresentando algum tipo de deformidade.

A faixa de irradiação por 120' apresentou acentuadas anormalidades nos estágios de gástrula e segmentação. No estágio de segmentação (Fig. 5I), a diferença foi significativa em relação aos demais tratamentos ($P = 0,027$). As malformações observadas foram acentuadas nas fases dos movimentos morfogênicos de epibolia e fechamento do blastóporo, com maior frequência nas fases de 50 e 70% de epibolia. Na segmentação, lenta diferenciação da cabeça e cauda comprometeram significativamente a ocorrência dos demais eventos, como surgimento das vesículas ótica e óptica. Todas as larvas eclodidas nesse tratamento foram classificadas como anormais.

No tratamento de irradiação por 150', a mortalidade foi acentuada a partir do estágio de segmentação. Não houve sobrevivência e eclosão nessa faixa, sinalizando um limite de tempo para irradiação UV dos oócitos da espécie.

Análise da ploidia por Citometria de Fluxo

Os resultados das análises em citometria de fluxo com as larvas eclodidas em cada tratamento são apresentados na Tabela 3. Nenhum tratamento com irradiação apresentou larvas diploides, e o grupo controle (fertilizado a fresco e sem irradiação) foi analisado como 100% normal diploide.

Na faixa de irradiação com 30', 62, 50% (10/16) das amostras eram haploides, possivelmente expressando apenas o material genético paterno. Do total de amostras analisadas, 37,50% (6/16) das larvas eram mosaicos. No tratamento com 60', o índice de larvas haploides subiu para 78,57% (11/14), com 21,43% (3/14) das amostras como mosaicos.

A faixa de irradiação UV com 90' apresentou os resultados mais promissores. Nesse tratamento, 100% das larvas analisadas (20/20) eram haploides e a sobrevivência, como descrito anteriormente, foi satisfatória, com $87,01 \pm 6,58\%$ de eclosão. O fato de 100% das larvas eclodidas nesse tratamento serem classificadas como anormais reforça a ploidia apontada pela análise em citometria, expressada pela chamada Síndrome Haploide.

Os embriões cujos oócitos foram irradiados por 120' foram igualmente 100% haploides, não apresentando, porém, um índice satisfatório de sobrevivência para posteriores manipulações ($28,68 \pm 27,34\%$). No tratamento de irradiação por 150', não houve sobrevivência e as amostras não tiveram sua ploidia analisada.

Dessa forma, a faixa de intervalos testada foi capaz de expressar o limite de tolerância dos oócitos da espécie *Astyanax altiparanae* para irradiação UV. Através do protocolo de solução para estocagem estipulado na etapa I, a irradiação dos gametas foi possível e a faixa ideal, unindo sucesso em inativar o material genético materno e manter a viabilidade e sobrevivência, estabelecida.

A observação dos pronúcleos por meio de microscopia de fluorescência mostrou que a irradiação dos oócitos na faixa de 90' não afeta o tempo de fusão já descrito para a espécie (Fig. 6).

	n° de oócitos	Desenvolvimento Embrionário (%)							
		N. Fert.	Clivagem	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Normal	Anormal
Controle	179	1,15 ± 0,63	98,85 ± 0,63	88,85 ± 7,79	86,71 ± 9,12	96,15 ± 1,96 ^a	98,63 ± 0,79	99,77 ± 0,23 ^a	0,23 ± 0,23 ^a
30'	126	6,19 ± 4,33	93,81 ± 4,33	77,75 ± 11,24	91,59 ± 2,21	89,26 ± 8,66 ^a	83,45 ± 2,59	0	100 ^b
60'	100	14,55 ± 11,24	85,45 ± 11,24	68,33 ± 17,59	75,38 ± 10,73	81,12 ± 13,63 ^a	89,98 ± 5,38	6,45 ± 6,45 ^b	93,55 ± 6,45 ^b
90'	101	17,42 ± 12,90	82,58 ± 12,90	62,36 ± 27,11	83,51 ± 4,78	74,56 ± 5,89 ^a	87,01 ± 6,58	0	100 ^b
120'	109	34,16 ± 28,93	65,84 ± 28,93	80,20 ± 2,95	88,20 ± 7,02	19,60 ± 16,03 ^b	28,68 ± 27,34	0	100 ^b
150'	135	17,71 ± 8,61	82,29 ± 8,61	70,33 ± 8,40	76,53 ± 4,38	17,83 ± 17,83 ^a	0	0	0

Tabela 2: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram fertilizados a fresco (controle) e irradiados com UV por 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após a extrusão.

	N° de oócitos	Ploidia		
		1n	2n	Mosaico
Controle	20	0	20/20	0
30'	20	10/16	0	6/16
60'	20	11/14	0	3/14
90'	20	20/20	0	0
120'	20	7/7	0	0

Tabela 3: Ploidia das larvas de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram fertilizados a fresco (controle) e irradiados com UV por 30, 60, 90 e 120 minutos após a extrusão.

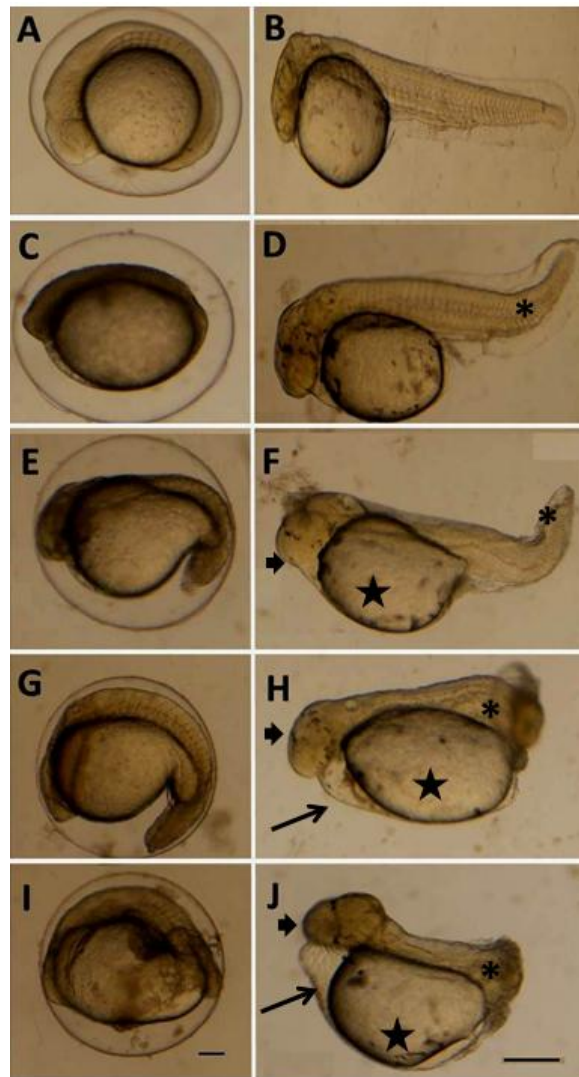


Figura 5: Embriões da espécie *Astyanax altiparanae* nos estágios de segmentação e eclosão. Embrião que não foram expostos à irradiação (controle) (A, B); embriões cujos oócitos foram irradiados por 30 segundos (C, D); embriões cujos oócitos foram irradiados por 60 segundos (E, F); embriões cujos oócitos foram irradiados por 90 segundos (G, H) e embriões cujos oócitos foram irradiados por 120 segundos e posteriormente fertilizados (I, J). Asteriscos indicam malformações na cauda; setas finas apontam padrão anormal de diferenciação do vitelo; setas grossas destacam diferenciação cranial anormal e estrelas a malformação e distribuição de vitelo. Barra de escala: 100 μm .

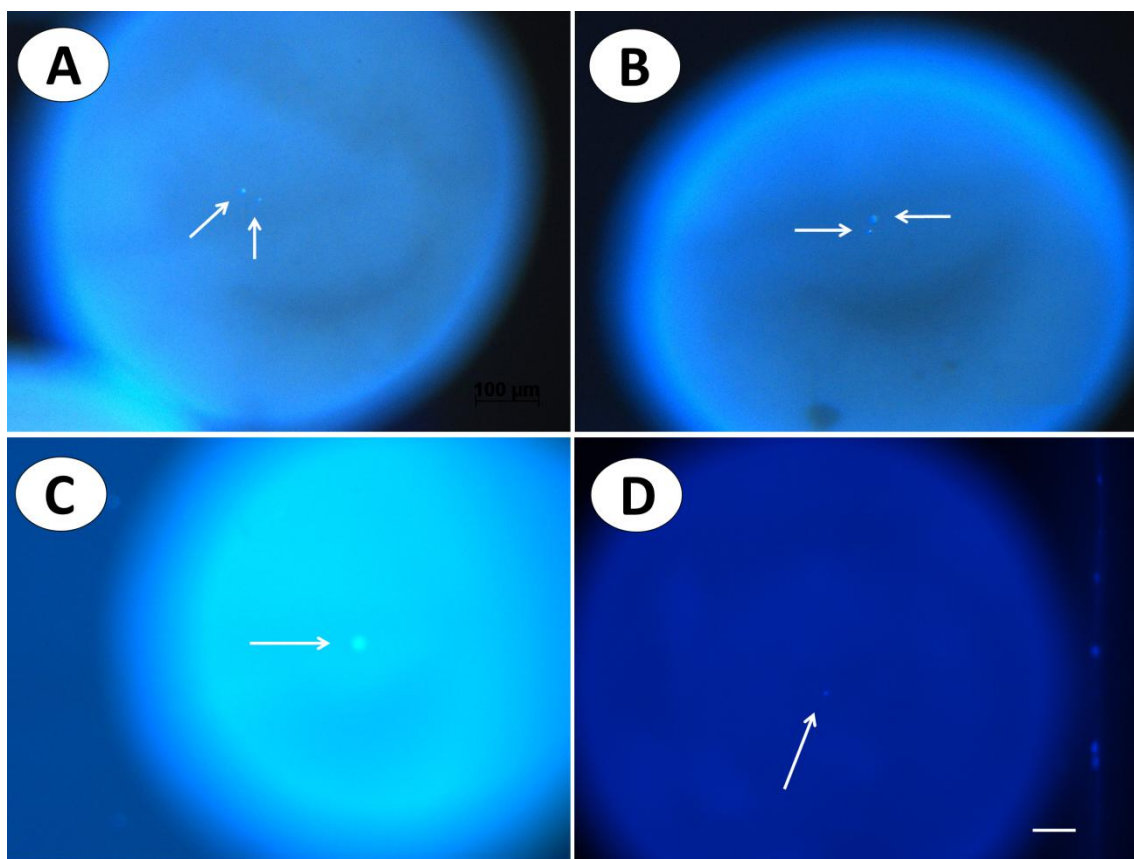


Figura 6: Observação dos pronúcleos nos ovos da espécie *Astyanax altiparanae* irradiados por 90'. Ovos com seis minutos pós fertilização, com pronúcleos ainda individualizados (A), ovos com oito minutos pós fertilização, com pronúcleos evidentes e ainda individualizados (B), ovos com dez minutos pós fertilização, com pronúcleos totalmente fundidos (C) e ovos com doze minutos pós fertilização fusionados (D). Setas indicam a localização dos pronúcleos. Barra de escala: 100 μ m.

Discussão

Foi determinado um meio ideal para estocagem dos oócitos para irradiação e manipulação cromossômica na espécie *Astyanax altiparanae*. Além disso, uma faixa confiável de intervalos de irradiação foi estabelecida, com um tratamento ideal para inativação do material genético materno.

Para indução à androgênese, essas etapas são fundamentais, sendo já investigadas em algumas espécies. Em todos esses estudos, a desnucleação dos oócitos hospedeiros por meio de irradiação UV e a manutenção da sua capacidade em ser fertilizado e se desenvolver é a primeira etapa primordial para o sucesso da indução e aplicação do protocolo. Além disso, quando a irradiação não é realizada em um meio de diluição ideal, os resultados são significativamente alterados (Myers *et al.*, 1995; Komen e Thorgaard, 2007).

Lin e Dabrowski (1998) estabeleceram sete meios de incubação dos oócitos para irradiação UV e posterior fertilização na espécie *Esox masquinongy*, entre elas o fluido ovariano artificial da própria espécie e uma combinação de soluções de Ringer com tripsina e BSA. Os autores destacaram bons resultados de embriogênese e eclosão posterior nos oócitos estocados nessas soluções, que foram capazes de manter a viabilidade dos gametas por 10 minutos, tempo suficiente para a irradiação UV.

Resultados similares foram relatados para a espécie *Oncorhynchus mykiss*, com as mesmas diluições e soluções (Erdahl *et al.*, 1987), evidenciando diferenças significativas com relação ao observado na espécie *Astyanax altiparanae* no presente estudo, que apontou a solução de Ringer como um meio inadequado para estocagem dos

oócitos. Essas etapas devem ser, desta forma, estabelecidas para cada modelo em estudo, visto que depende de características altamente espécie-específicas.

Além disso, a utilização do próprio fluído ovariano pode não ser o meio ideal, visto que podem apresentar diferentes teores devido à variação sazonal, e não são prontamente disponíveis em todo o ano (Yasui *et al.*, 2010), comprometendo a possibilidade de replicação dos ensaios.

Os mecanismos relacionados a alterações na morfologia dos oócitos causadas pela exposição a um tipo específico de solução não são bem conhecidos (Brooks *et al.*, 1997; Lin e Dabrowski, 1998). Após o estabelecimento da solução e da faixa de tempo em que ela é capaz de manter a viabilidade dos oócitos, o presente estudo concluiu que a irradiação UV é capaz de inativar o material genético materno.

As faixas obtidas no presente protocolo foram semelhantes ao observado por Bongers *et al* (1994), Myers *et al* (1995), Arai *et al* (1995) e Lin e Dabrowski (1998) para irradiação UV de oócitos nas espécies *Oreochromis niloticus*, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Cyprinus carpio* e *Esox masquinongy*, respectivamente. No entanto, destaca-se a diferença percentual de sobrevivência nesses trabalhos com relação ao presente estudo.

Em *Astyanax altiparanae*, o percentual de sobrevivência de embriões 100% haploides em decorrência da irradiação dos oócitos foi de $87,01 \pm 6,58\%$, muito superior ao obtido nestes trabalhos: 22,9% em *Oreochromis niloticus* (Myers *et al.*, 1995), 22% em *Misgurnus anguillicaudatus* (Arai *et al.*, 1995) e 22,5% em *Esox masquinongy* (Lin e Dabrowski, 1998).

O resultado descrito por Bongers *et al* (1994) com *Cyprinus carpio* deixa ainda mais evidente a eficácia do nosso estudo com *Astyanax altiparanae*. Os autores relatam

incidência de 53,9% de indivíduos haploides após a irradiação UV, enquanto que o presente estudo destacou 100% de haploides na faixa com 90 segundos de irradiação. Já Lin e Dabrowski (1998) só alcançaram 100% de indivíduos haploides a partir de 240 segundos de irradiação.

Esta sensibilidade variável a irradiação UV entre as espécies pode ser explicada, principalmente, por diferenças na estrutura do córion, tamanho do oócito e posição relativa do pronúcleo feminino (Myers *et al.*, 1995). Além disso, a radiação pode desencadear aberrações cromossômicas estruturais em diferentes níveis de acordo com cada espécie, produzindo uma dispersão aumentada de DNA celular em populações de células em proliferação e, conseqüentemente, malformações (George *et al.*, 1991).

Esses danos cromossômicos induzidos pela exposição à radiação UV pode ser a causa da ocorrência do aumento nas variações de conteúdo de DNA observadas nas análises em citometria de fluxo (Lamb *et al.*, 1991). Lin e Dabrowski (1998) também observaram esses comportamentos utilizando a mesma metodologia de análise.

Assim como destacado por Lin e Dabrowski (1998), foi possível observar uma grande incidência de larvas no momento da eclosão que apresentavam malformações estruturais e musculares que caracterizam a “Síndrome Haploide”. Os autores afirmam que o conteúdo de DNA destas larvas anormais não apresentavam diferença com relação as do grupo controle, mas a citometria de fluxo apontava mosaicismos entre as mesmas. Com *Astyanax altiparanae*, destacamos uma incidência de 37,5% de mosaicos no tratamento com irradiação por 30 segundos e de 21,43% no tratamento com 60 segundos.

Lin e Dabrowski (1998) destacam, ainda, que a ocorrência de mosaicos nesses casos indicam que a irradiação UV em diferentes dosagens pode causar mutações nos

genomas dos peixes, resultando em embriões anormais com as mesmas características morfológicas dos indivíduos haploides.

Os resultados do presente estudo trazem dois importantes protocolos para indução à androgênese na espécie *Astyanax altiparanae*: foi estabelecida uma solução ideal para estocagem dos oócitos para irradiação, por um tempo que supre de forma eficiente o período da exposição; e uma faixa ótima para inativação do material genético materno foi padronizada com confiança, representando um limite para a sobrevivência e viabilidade dos embriões. O trabalho serve como base para o desenvolvimento de biotecnologias inéditas na manipulação cromossômica e produção de androgenéticos em *Astyanax altiparanae*.

Referências Bibliográficas

Arai, K.; Masaoka, T.; Suzuki, R. **Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs**. Nippon Suisan Gakkaishi v.58, p.1197-1201, 1992.

Arai, K.; Ikeno, M.; Suzuki, R. **Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa from natural tetraploids**. Aquaculture 137:131–138. 1995.

Bongers, A. B. J.; In't Veld, E. P. C.; Abo-Hashema, K.; Bremmer, I. M.; Eding, E. H.; Komen, J.; Richter, C. J. J. **Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using**

UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. *Aquaculture* 122:119–132. 1994.

Brooks, S.; Tyler, C. R.; Sumpter, J. P. **Egg quality in fish: what makes a good egg?** *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 7 (4): 387-416. 1997.

Erdahl, A. W.; Cloud, J. G.; Graham, E. F. **Fertility of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gametes: gamete viability in artificial media.** *Aquaculture* 60:323–332. 1987.

Fujimoto, T., Sakao, S., Yamaha, E., Arai, K. **Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome.** *Journal of Experimental Zoology*, v.307A, p.449-462. 2007.

George, L. S.; Dallas, C. E.; Brisbin, I. L. Jr.; Evan, D. L. **Flow cytometric DNA analysis of ducks accumulating ¹³⁷ Cs on a reactor reservoir.** *Ecotoxicol Environ Safe* 21:337–347. 1991.

Komen, H.; Thorgaard, G. H. **Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review.** *Aquaculture* 269, 150-173. 2007.

Lamb, T.; Bickham, J. W.; Gibbons, J.W.; Smolen, M. J.; McDowell, S. **Genetic damage in a population of slider turtle (*Trachemys scripta*) inhabiting a radioactive reservoir.** Arch Environ Contam Toxicol 20:138–142. 1991.

Lin, F.; Dabrowski, K. **Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry.** Molecular Reproduction and Development, v.49, p.10-18. 1998.

Morishima, K.; Fujimoto, T.; Sato, M; Kawae, A.; Zhao, Y.; Yamaha, E.; Arai, K. **Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to induce androgenesis in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*).** BMC Biotechnology v.11, p.1-16, 2011.

Myers, J. M.; Penman, D. J.; Basavaraju, Y.; Powell, S. F.; Baopraserkul, P., Rana, K. J.; Bromage, N.; McAndrew, B. J. **Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.).** Theor Appl Genet 90:205–210. 1995.

Ocalewicz, K.; Dobosz, S.; Kuzminski, H.; Goryczko, K. **Formation of chromosome aberrations in androgenetic rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.** Journal of Fish Biology. 75, 2373-2379. 2009.

Paschos, I.; Natsis, L.; Nathanailides, C.; Kagalou, I.; Kolettas, E. **Induction of gynogenesis and androgenesis in goldfish *Carassius auratus* (var. oranda).**

Reproduction in Domestic Animals. 36, 195-198. 2001.

Pereira-Santos, M.; Yasui, G. S.; Xavier, P. L. P.; Adamov, N. S. M.; Nascimento, N. F.; Fujimoto, T.; Senhorini, J. A.; Nakaghi, L. S. O. **Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae).** Zygote 1-13. 2016.

Yasui, G.S.; Arias-Rodriguez, L.; Fujimoto, T.; Arai, K. **A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species.** Animal Reproduction Science, v. 116, p. 335-345, 2009.

Yasui, G.S.; Fujimoto, T.; Arai, K. **Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis.** Aquaculture, v.308, p.S140–S144, 2010.

Yasui, G. S.; Fujimoto, T.; Arias-Rodriguez, L.; Takagi, Y.; Arai, K. **The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*.** Aquaculture (Amsterdam), v. 344-349, p. 147-152, 2012.

Yoshikawa, H.; Morishima, K.; Fujimoto, T.; Arias-Rodrigues, L.; Yamaha, E.; Arai, K.

Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach: a review. *J. Appl. Ichthyol.*

24, 410–414. 2008.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA / ICMBio), pelo fornecimento de toda a estrutura física, fornecimento de material biológico e suporte técnico necessários e à FAPESP (2010/17429-1 e 2011/11664-1) e Capes, pelo financiamento do projeto de pesquisa em forma de auxílio Jovens Pesquisadores e bolsa de doutorado.

Capítulo III

Capítulo III: Fertilização dos oócitos irradiados da espécie *Astyanax altiparanae* com machos de *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albinos.

Sumário

Resumo.....	113
Introdução.....	114
Material e Métodos.....	117
Resultados.....	122
Discussão.....	134
Referências Bibliográficas.....	136
Agradecimentos.....	140

Resumo

Em peixes, uma alternativa para recuperar a diploidia dos embriões após a irradiação UV dos oócitos para produção de androgenéticos pode ser a aplicação de choques de temperatura para inibir a primeira clivagem ou ainda a fertilização com mais de um espermatozoide. O objetivo deste trabalho foi induzir androgenéticos das espécies *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino, utilizando oócitos de *Astyanax altiparanae* e um método para fertilização com mais de um espermatozoide. Os oócitos de *Astyanax altiparanae* foram irradiados com 90 mW/cm² de radiação UV, e tiveram o córion removido com enzima pronase (0,05%). Posteriormente, eles foram separados em alíquotas e fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino. Alíquotas de oócitos frescos (não irradiados) e sem remoção de córion também foram fertilizadas com sêmen de cada espécie, atuando como controle para os tratamentos. Todos os tratamentos que receberam radiação UV e não tiveram o córion removido com pronase foram haploides, apresentando anormalidades e malformações características da “Síndrome Haploide”. Os oócitos que tiveram córion removido com pronase e foram fertilizados com sêmen de *Astyanax fasciatus* não apresentaram sobrevivência, e o tratamento com irradiação e remoção do córion com pronase apresentou índice de eclosão de 25,00 ± 25,00. Os oócitos fertilizados com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino que foram previamente irradiados e tiveram o córion removido com pronase apresentaram um percentual de eclosão de larvas normais de 7,90 ± 4,30%, diferindo significativamente do controle de oócitos frescos fertilizados com sêmen da espécie, que foi de 87,36 ± 12,26% ($P = 0,08$). Os tratamentos com irradiação, remoção do córion e fertilização com sêmen de *Astyanax altiparanae* e de

Hyphessobrycon anisitsi albino apresentaram, respectivamente, 6,75% e 18,12% de embriões diploides, sinalizando uma alternativa para a produção de androgenéticos diploides em espécies neotropicais.

Palavras – chave: Androgênese, híbrido, irradiação, tetra, sêmen.

Introdução

A androgênese é uma interessante biotecnologia de manipulação cromossômica porque a progênie resultante é completamente homozigótica, possuindo cromossomos originados de uma única fonte parental. Como técnica de manejo reprodutivo, apresenta muitos potenciais de aplicação, incluindo a criação de linhagens puras, a possibilidade de se produzir parentais machos homogaméticos conhecidos como "supermachos" (especialmente nos casos em que se prefere cultivar os machos por apresentarem um maior crescimento em relação às fêmeas), e a recuperação de espécies ameaçadas a partir de sêmen criopreservado (Arai *et al.*, 1992; Carrillo e Chacón, 1995).

A fertilização do oócito inativado pode ser feita com gametas masculinos previamente congelados ou resfriados, garantindo sua disponibilidade no momento exato da fertilização, ou até mesmos frescos, provenientes de machos da mesma espécie ou de espécies filogeneticamente próximas. A utilização de gametas de espécies diferentes é possível, pois os espermatozoides de peixes teleósteos não têm acrossoma, fato que coincide com a presença da micrópila nos oócitos (Pandian e Kirankumar, 2003). Desta forma, desde que a entrada do espermatozoide na micrópila se faça

possível, a fertilização em peixes é um evento não espécie específico. Assim, a inseminação interespecífica bem sucedida é a estratégia mais importante para técnicas como a clonagem ou androgênese interespecíficas (César *et al.* 2006).

Não existem relatos na literatura sobre aplicações da androgênese em espécies nativas ou mesmo neotropicais, o que seria de grande importância tanto para a conservação genética de muitas espécies, como para estudos sobre herança genética, principalmente materna. Diante disso, a espécie *Astyanax altiparanae* surge como um interessante modelo para a padronização destes tipos de protocolos em espécies nativas, por diversos motivos: sua ampla distribuição, a diversidade de espécies filogeneticamente próximas na natureza que podem atuar como doadoras de espermatozoides, a alta taxa de fecundidade, diferenciação sexual controlável, manejo reprodutivo facilitado e conhecimento da biologia reprodutiva e da embriogênese já bem descritos e conhecidos (Pereira-Santos *et al.*, 2016).

Para confirmação do protocolo de indução à androgênese, o uso de espermatozoides de espécies filogeneticamente próximas é uma interessante ferramenta, visto que, após a inativação do material genético materno, a única herança genética das progênes deverá ser a paterna, de uma espécie diferente. No caso da espécie *Astyanax altiparanae*, uma diversidade de espécies próximas podem ser utilizadas com sucesso nesse sentido por apresentarem ultraestrutura dos gametas bem semelhantes, entre elas *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albinos. Esses dois modelos são especialmente interessantes por apresentarem características morfológicas particulares que permitem a sua distinção, como a nadadeira caudal vermelha em *Astyanax fasciatus* e o albinismo em *Hyphessobrycon anisitsi*. Tais heranças paternas seriam comprovações genéticas e morfológicas do sucesso na inativação do material genético materno e consequente androgênese.

No entanto, após a inativação do material genético materno por exposição à radiação UV, a diploidia da progênie deve ser recuperada para garantir a sobrevivência das larvas. Para reverter o estado haploide provocado pela radiação dos oócitos, a duplicação do genoma pode ser realizada através da inibição da primeira divisão mitótica por meio de pressão ou de choque térmico (Komen e Thorgaard, 2007), fertilização com gametas de indivíduos poliploides (Yoshikawa *et al.*, 2008) ou ainda com a fertilização com mais de um espermatozoide (Clifton e Pandian, 2008).

Uma das maneiras de facilitar a fertilização do oócito por mais de um espermatozoide seria promovendo a remoção do córion, uma das estratégias de prevenção à polispermia em peixes. Nesse caso, enzimas como a tripsina e a pronase podem ser utilizadas como meios de diluição do córion para posterior fertilização (Hallerman *et al.*, 1988; Henn e Braunsbeck, 2011).

Desta forma, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de padronizar a técnica de androgênese na espécie *Astyanax altiparanae*, através da fertilização com sêmen de *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albinos e resgatando a diploidia da progênie por meio da remoção do córion com pronase e posterior fertilização.

O choque térmico para inibição da primeira divisão da clivagem e consequente restauração do estado diploide não foi eficaz para a espécie, onde não foi verificado sobrevivência após a aplicação do choque.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no uso de Animais do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEUA / CEPTA # 02031.000007/2016- 65).

Indução a reprodução e coleta dos gametas

A Figura 1 esquematiza a metodologia realizada nas etapas de irradiação dos oócitos de *Astyanax altiparanae*, remoção do córion e posteriores fertilizações com sêmen de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino. Foram utilizadas fêmeas maduras da mesma idade, morfologicamente aptas para a reprodução através de características como abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada e tamanho e coloração uniforme dos oócitos.

Após esta seleção prévia, os animais foram transferidos para ambientes de temperatura controlada (28°C) e receberam tratamento hormonal para indução a reprodução, com hormônio sintético Ovopel® (D-Ala, Pro-Net-mGnRH) (Unic-trade, Hungria), na concentração de 3mg kg⁻¹, em dose única. Após aproximadamente seis horas, os animais foram transferidos para solução anestésica de mentol para os procedimentos de extrusão artificial e coleta dos oócitos, que foram transferidos para placa de Petri de plástico de 100 mm coberta com uma película de plástico, em ambiente de temperatura controlada a 26°C (ver Pereira – Santos *et al.*, 2016).

O sêmen das três espécies utilizadas foi coletado de machos maduros, da mesma idade das fêmeas (aproximadamente cinco meses, com 6 cm de comprimento), após tratamento com o mesmo protocolo de indução hormonal. Com cerca de seis horas de ação do hormônio, os mesmos foram separados e transferidos para solução anestésica de mentol para o procedimento de coleta. O sêmen foi coletado utilizando uma micropipeta de 1000 µL Eppendorf (Eppendorf, Alemanha) e imediatamente transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 400 µl de solução de Ringer modificado (NaCl 128,3 mM, KCl 23,6 mM, CaCl₂ 3,6 mM, MgCl₂ 2,1 mM) sendo, em seguida, mantido a 2,5°C. A qualidade espermática foi mensurada com base na motilidade dos espermatozoides (ver Yasui *et al.*, 2009, 2012), e apenas amostras apresentando motilidade progressiva acima de 80% foram utilizadas para os ensaios de fertilização.

Irradiação dos oócitos

Para irradiação dos oócitos, uma alíquota (aproximadamente 200 oócitos) foi depositada em placa de Petri (135 mm de diâmetro), juntamente com 8,0 mL de solução dPBS (ver Capítulo II). Os oócitos foram irradiados em câmara UV por 90 mW/cm².

Alíquotas de oócitos das diferentes doses de irradiação foram fertilizadas com aproximadamente 18 µL de sêmen fresco de cada uma das três espécies, e os gametas ativados com a adição de 20 mL de água do tanque, sendo os ovos incubados em placas de Petri à temperatura ambiente de 26,0°C (temperatura controlada).

Como controle, uma alíquota de cerca de 100 oócitos intactos da mesma desova utilizada na irradiação também foi fertilizada com 18 µL de sêmen fresco de

Astyanax altiparanae, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino; os gametas foram ativados com a adição de 20 mL de água do tanque e os ovos incubados em placas de Petri sob as mesmas condições mantidas nos tratamentos de irradiação. Trocas parciais de água foram realizadas periodicamente no decorrer do período de incubação nas placas de Petri.

Assim, esta etapa da metodologia totalizou seis tratamentos: um controle de oócitos não irradiados e fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae*, um controle de oócitos não irradiados e fertilizados com sêmen de *Astyanax fasciatus* (híbrido), um controle de oócitos não irradiados e fertilizados com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino (híbrido), um tratamento com oócitos irradiados e fertilizados com sêmen fresco de *Astyanax altiparanae*, um tratamento de oócitos irradiados e fertilizados com sêmen fresco de *Astyanax fasciatus* e um tratamento de oócitos irradiados e fertilizados com sêmen fresco de *Hyphessobrycon anisitsi* albino.

Remoção enzimática do córion

Para remoção do córion dos oócitos antes da irradiação e fertilização, alíquotas foram divididas e diluídas em solução de enzima Pronase isolada de *Streptomyces griseus* (Sigma #P8811-1G) (0,05%) associada a 0,5% de BSA com solução de dPBS (ver Capítulo II). Foram divididas três alíquotas: um tratamento irradiado e fertilizado com sêmen de *Astyanax altiparanae*, um tratamento irradiado e fertilizado com sêmen de *Astyanax fasciatus* e um tratamento irradiado e fertilizado com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino. Para cada uma das alíquotas, um controle de oócitos

frescos foi fertilizado com sêmen de cada uma das espécies, totalizando seis tratamentos.

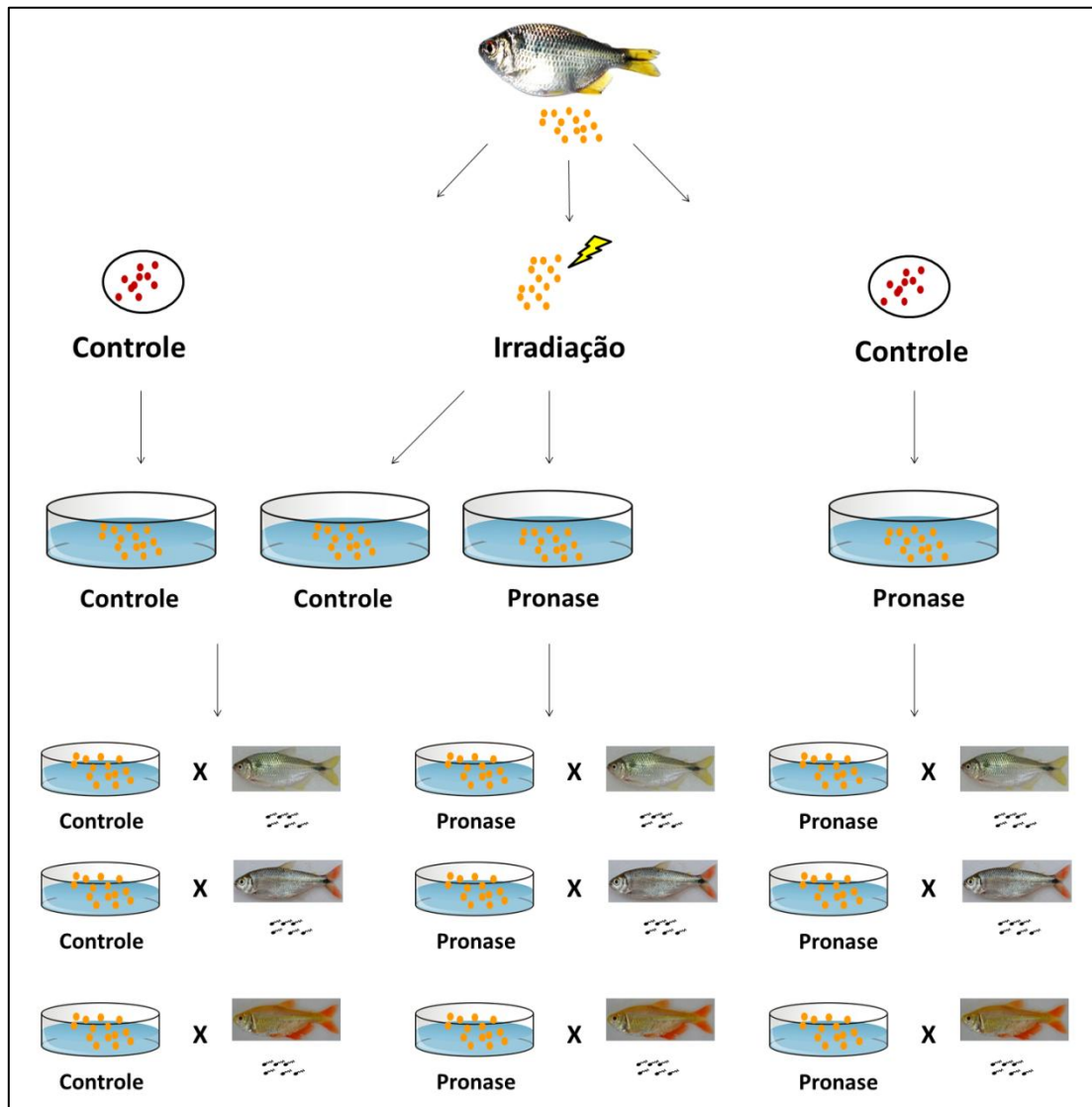


Figura 1: Esquema da metodologia realizada para irradiação, remoção do córion e fertilização de oócitos de *Astyanax altiparanae* com sêmen de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi albino*.

Análise do Desenvolvimento Embrionário

O desenvolvimento embrionário foi acompanhado por meio de estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japão) e imagens digitais tomadas através de uma câmera CCD (Nikon DS-F1, Nikon, Tokyo, Japan) empregando-se o software Nis-Ar Elements (Nikon, Tokyo, Japan).

Foram descritos e observados os estágios de duas células, blástula, gástrula, segmentação e eclosão, sendo possível averiguar a “Síndrome Haploide” dos embriões caracterizada por diversas anormalidades nos tratamentos que receberam radiação UV. Para a aferição da taxa de fertilização foram contabilizados os embriões vivos e mortos. A taxa de eclosão também foi mensurada verificando-se a porcentagem de larvas normais e anormais (ver Pereira-Santos *et al.*, 2016).

Citometria de fluxo

As larvas recém eclodidas foram transferidas para microtubo de 1,5 mL contendo 120 μL de solução de lise. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação em vortex por intervalos de 5 minutos e coradas com adição de 800 μL de Dulbecco's PBS (Sigma #D5773) contendo 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de corante DAPI. As amostras foram então filtradas por peneira de 30 μm (Celltrics, Partec, Germany) e analisadas por citômetro de fluxo Partec CyFlow Ploidy Analyzer (Partec GmbH, Alemanha) com filtro específico DAPI (358 nm). Foi utilizado um kit

comercial adotado para análises em aquicultura e agricultura (Partec CyStain DNA 2-step, Partec GmbH, Alemanha).

Estatística

Os dados são apresentados como média \pm EP (erro padrão). Todos os experimentos foram realizados em três repetições, usando diferentes fontes de oócitos. Os dados foram verificados quanto à normalidade utilizando o teste Liliefors, em seguida, comparados usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey (0,05). O software Statistica 11 foi utilizado para a análise estatística.

Resultados

Os índices de sobrevivência nos estágios de desenvolvimento embrionário nos tratamentos fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Todos os tratamentos fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* apresentaram sobrevivência e eclosão.

Os tratamentos com fertilização de oócitos frescos (não irradiados) e dos que tiveram o córion removido com pronase não apresentaram anormalidades ou malformações, com índices satisfatórios de eclosão e sobrevivência (Figs. 2A-F). Entre as principais anormalidades observadas nos demais tratamentos, destacou-se, entre os oócitos irradiados, malformações no estágio de blástula (Fig. 2G), com células se desprendendo da blastoderme com o decorrer das divisões celulares, comprometendo os

estágios posteriores. Este evento é característico da “Síndrome Haplóide”, levando conseqüentemente a malformações características nos estágios posteriores.

Durante o estágio de gástrula, foram descritas malformações na conformação e estrutura do vitelo, consequência de uma assincronia nos movimentos de epibolia (Fig. 2H). Os embriões nesse tratamento encontravam-se em diferentes níveis de desenvolvimento ao longo das fases de gástrula. No estágio subsequente, a segmentação apresentava número reduzido de somitos (Fig. 2H) em relação aos demais embriões de outros tratamentos no mesmo intervalo, sinalizando um retardo no desenvolvimento embrionário que posteriormente afetou a sobrevivência e eclosão de larvas normais. Além disso, os embriões também apresentavam malformações na região caudal (Fig. 2I).

No tratamento com irradiação UV e remoção do córion com pronase, os embriões apresentaram malformações bem características ao longo dos estágios de blástula, gástrula e segmentação. No estágio de blástula, persistiram as malformações da blastoderme, característica de embriões haploides (Fig. 2J). Os embriões em estágio de segmentação (Fig. 2K) apresentaram malformações na cauda, cabeça e conformação do vitelo. Além disso, também apresentavam células se desprendendo em diferentes camadas, comprometendo sua sobrevivência (Fig. 2L).

Os resultados observados com os tratamentos de fertilização com sêmen de *Astyanax fasciatus* são apresentados na Tabela 1. No tratamento com remoção de córion com pronase sem irradiação UV, não houve sobrevivência e eclosão, com mortalidade total dos embriões a partir do estágio de segmentação. Esses resultados indicam uma maior sensibilidade dos embriões híbridos destas espécies à exposição por pronase e conseqüente ausência de proteção mecânica do córion.

As principais malformações e anormalidades observadas ao longo do desenvolvimento embrionário dos tratamentos foram persistentes também nos estágios de blástula, gástrula, segmentação e eclosão (principalmente nos tratamentos com irradiação). A fertilização dos oócitos sem irradiação e sem remoção de córion deu origem a embriões com padrões normais de desenvolvimento ao longo dos estágios de embriogênese (Figs 3 A-C). O percentual de eclosão de larvas normais foi de $77,55 \pm 16,66\%$ (Tab. 1).

As principais malformações observadas no tratamento com remoção de córion e fertilização foram descritas nas fases do estágio de gástrula (Fig. 3,H) representadas por assincronia dos movimentos morfogenéticos de epibolia característicos deste estágio, além de má conformação e distribuição de vitelo. No entanto, não houve diferença significativa entre os demais tratamentos durante a sobrevivência neste estágio ($P=0,08$).

No tratamento com irradiação dos oócitos e posterior fertilização, os embriões apresentaram malformações mais evidentes nos estágios de gástrula e segmentação (Figs. 3H,I). No estágio de gástrula, persistiram anormalidades nos movimentos de epibolia e convergência, e na segmentação destacaram-se anomalias na diferenciação da cabeça e da cauda, fases iniciais do estágio de segmentação. Nesse estágio, houve diferença significativa com relação ao grupo controle (oócitos frescos não irradiados) ($P = 0,08$).

No tratamento com irradiação dos oócitos, remoção do córion e fertilização com sêmen de *Astyanax facistus*, as malformações observadas foram recorrentes nos estágios de blástula, gástrula e segmentação (Figs. 3J,K,L). No estágio de blástula, foram descritas diversas malformações nas divisões celulares da blastoderme, que

acabaram refletindo sobre as primeiras fases do estágio de gástrula. Nesse momento, os embriões apresentavam malformações nos movimentos de epibolia, que mostraram-se assíncronos. No estágio de segmentação, as malformações observadas nesse tratamento foram durante a diferenciação da cabeça e da cauda, além da estrutura e conformação do vitelo. A principal anormalidade observada foi a assincronia no crescimento com relação aos demais tratamentos. Os embriões apresentavam número reduzido de somitos, indicando retardo no desenvolvimento. Todos os tratamentos com irradiação UV e fertilização com sêmen de *Astyanax fasciatus* não apresentaram eclosão de larvas normais.

A sobrevivência ao longo da embriogênese dos tratamentos cujos oócitos de *Astyanax altiparanae* foram fertilizados com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino é apresentada na Tabela 2. Não foram observadas anormalidades e malformações ao longo do desenvolvimento embrionário do cruzamento híbrido que pudessem comprometer a sobrevivência pós-eclosão. No entanto, os tratamentos cujos oócitos receberam radiação UV antes da fertilização apresentaram padrões constantes de anormalidades, persistindo até a fase larval, caracterizando a “Síndrome Haploide”.

A sobrevivência foi comprometida devido a tais anormalidades, tanto no tratamento com oócitos irradiados e fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* quanto no tratamento com oócitos irradiados e fertilizados com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino. O percentual de eclosão de larvas normais foi o mais comprometido nesses tratamentos, diferindo significativamente dos demais tratamentos ($P = 0,070$).

No tratamento de irradiação e fertilização com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino, as principais malformações foram observadas nos estágios de gástrula e

segmentação (Figs. 4H, I). No estágio de gástrula, os embriões apresentavam algumas disfunções nos movimentos morfogenéticos de epibolia, sendo que a maioria das amostras analisadas apresentava uma distribuição desuniforme de vitelo. No estágio de segmentação, as principais malformações observadas foram na região cefálica e caudal, com um número de somitos inferior ao observado nos tratamentos sem irradiação no mesmo período de incubação, sinalizando um retardo no desenvolvimento propício ao surgimento de anormalidades.

A agressividade dos tratamentos submetidos à remoção de córion com a enzima pronase também se manifestou entre os embriões fertilizados com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino, caracterizando-se por perda de células durante as divisões ao longo de todos os estágios da embriogênese, causando malformações leves a moderadas (Figs 4. J, K, L).

Citometria de fluxo

Os resultados das análises em citometria de fluxo são descritos na Tabela 3. Os tratamentos que não afetaram os oócitos com radiação UV ou remoção de córion com pronase foram 100% diploides, atuando como controle para os demais. Os cruzamentos híbridos, que apresentaram sobrevivência e eclosão satisfatórios, também foram 100% diploides.

A remoção do córion com pronase e posterior fertilização com sêmen de *Astyanax altiparanae* não alterou a ploidia dos embriões, que tiveram 100% das amostras analisadas como diploides. No mesmo tratamento e fertilização com sêmen de

Astyanax fasciatus, não houve sobrevivência e eclosão e no tratamento com fertilização com sêmen de *Hyphessobrycon anisitsi* albino, 2,50% das amostras analisadas eram mosaicos, sendo o restante diploide.

Todos os tratamentos que receberam radiação UV e cujo córion não foi removido com pronase apresentaram-se 100% haploides, confirmando a eficácia do protocolo de indução (ver Capítulo II). A fertilização com sêmen das três espécies originaram embriões haploides que apresentaram aspectos morfológicos que caracterizam a “Síndrome Haploide”.

A irradiação UV associada à remoção do córion dos oócitos antes da fertilização, estratégia para indução de androgenético com restauração da ploidia sem choque, apresentou resultados interessantes nos tratamentos fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino. No caso de *Astyanax altiparanae*, 6,75% das amostras eram diploides, sendo 12,50% mosaicos. O índice de embriões diploides sinaliza a fertilização com dois espermatozoides. Em *Hyphessobrycon anisitsi* albino, o índice de embriões diploides foi ainda maior, chegando a 18,12%, sendo 81,88% haploides.

Não houve sobrevivência nesse tratamento com fertilização com sêmen de *Astyanax fasciatus*. Os resultados obtidos sugerem um protocolo alternativo na indução de androgenéticos diploides.

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* cujos oócitos foram fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus*. **Legenda** dos tratamentos: L x L (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*), L x F (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*), L x L p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x F p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x L UV (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à radiação UV), L x F UV (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*, cujos oócitos foram expostos à radiação UV), L x L UV p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV) e L x F UV p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *A. fasciatus*, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV).

	N° de ovos	Estágios do Desenvolvimento (%)							
		Não Fert.	Clivagem	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Normais	Anormais
L x L	377	3,16 ± 2,11	96,85 ± 2,11	98,39 ± 1,03	82,70 ± 14,31	89,14 ± 2,79 ^a	90,56 ± 4,75 ^a	82,06 ± 9,68 ^a	17,94 ± 9,68
L x F	294	3,88 ± 2,16	96,12 ± 2,16	97,86 ± 0,82	77,58 ± 17,19	89,14 ± 4,60 ^a	86,93 ± 5,84 ^a	77,55 ± 16,66 ^a	22,45 ± 16,66
L x L p	351	12,33 ± 5,39	87,67 ± 5,39	87,44 ± 8,98	74,47 ± 16,64	20,13 ± 16,32 ^b	27,27 ± 24,34 ^{ab}	17,5 ± 17,50 ^b	32,50 ± 17,50
L x F p	303	18,00 ± 6,22	82,00 ± 6,22	91,74 ± 4,72	90,45 ± 2,25	12,78 ± 12,78 ^b	0 ^b	0 ^b	0
L x L UV	206	8,53 ± 2,25	91,47 ± 2,25	97,51 ± 0,85	82,31 ± 15,12	25,03 ± 12,50 ^b	38,54 ± 22,66 ^{ab}	0 ^b	50,00 ± 28,87
L x F UV	201	10,31 ± 3,60	89,69 ± 3,60	96,07 ± 1,62	92,05 ± 2,98	27,90 ± 15,56 ^b	37,95 ± 22,34 ^{ab}	0 ^b	50,00 ± 28,87
L x L p UV	158	5,35 ± 2,35	94,65 ± 2,35	95,18 ± 1,27	89,39 ± 4,56	0,50 ± 0,50 ^b	12,5 ± 12,50 ^{ab}	0 ^b	25,00 ± 25,00
L x F p UV	134	8,57 ± 2,24	91,43 ± 2,24	91,25 ± 3,91	90,44 ± 4,35	0,14 ± 0,15 ^b	25,00 ± 25,00 ^{ab}	0 ^b	25,00 ± 25,00

Tabela 2: Desenvolvimento embrionário de oócitos da espécie *Astyanax altiparanae* fertilizados com sêmen de *Astyanax altiparanae* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino. **Legenda** dos tratamentos: L x L (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*), L x A (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino), L x L p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x A p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino, cujos oócitos foram expostos à pronase), L x L UV (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à radiação UV), L x A UV (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino, cujos oócitos foram expostos à radiação UV), L x L UV p (cruzamento de fêmea com macho da espécie *A. altiparanae*, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV) e L x A UV p (cruzamento de fêmea de *A. altiparanae* com macho de *H. anisitsi* albino, cujos oócitos foram expostos à pronase e à radiação UV).

	N° de ovos	Estágios do Desenvolvimento (%)							
		Não Fert.	Clivagem	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Normais	Anormais
L x L	137	0±0 ^a	100±0 ^a	100±0,00 ^a	81,60±11,90	88,15±3,39	95,21±0,92	87,36±12,26 ^a	12,64± 12,24 ^a
L x A	157	0,90±0,50 ^{ab}	99,10±0,50 ^{ab}	99,76±0,14 ^{ab}	70,39±12,21	79,39±8,07	73,44±8,24	69,15± 8,69 ^a	30,85±8,69 ^{ab}
L x L p	190	1,59±0,47 ^{ab}	98,42±0,47 ^{ab}	98,01±1,42 ^{ab}	80,41±9,27	62,28±11,58	59,60±19,41	64,04±17,59 ^a	35,96±17,59 ^{ab}
L x A p	138	1,72±0,42 ^{ab}	98,28±0,42 ^{ab}	98,67±0,40 ^{ab}	68,36±3,43	55,20±6,07	65,54±4,14	46,86±8,55 ^{ab}	53,14±8,55 ^{abc}
L x L UV	135	1,36±0,75 ^{ab}	98,64±0,75 ^{ab}	99,42±0,43 ^{ab}	79,74±10,44	65,89±10,90	63,11±14,87	1,36±1,36 ^c	98,64±1,36 ^{bc}
L x A UV	161	2,35±0,63 ^{ab}	97,65±0,63 ^{ab}	99,00±0,55 ^{ab}	68,45±10,04	62,28±13,25	47,75±12,84	0±0,00 ^c	100±0,00 ^c
L x L UV p	149	7,16±3,42 ^b	92,84±3,42 ^b	95,11±2,30 ^b	71,42±13,29	51,77±19,95	45,30±20,40	6,84±6,08 ^{bc}	93,16± 23,41 ^{abc}
L x A UV p	133	8,69±4,12 ^b	91,31±4,12 ^b	96,24±1,25 ^b	76,64±5,87	48,12±17,50	34,83±20,08	7,90±4,30 ^{bc}	92,10±22,63 ^{abc}

Tabela 3: Citometria de fluxo dos doze tratamentos com irradiação, remoção de córion e fertilização.

	N° de larvas	Ploidia (%)		
		1n	2n	Mosaico
<i>Astyanax altiparanae</i>				
L x L	20	0	100	0
L x L p	10	0	100	0
L x L UV	10	100	0	0
L x L UV p	17	80,75	6,75	12,50
<i>Astyanax fasciatus</i>				
L x F	20	0	100	0
L x F p	0	0	0	0
L x F UV	14	100	0	0
L x F UV p	0	0	0	0
<i>Hypheosobrycon anisitsi albino</i>				
L x A	20	0	100	0
L x A p	20	0	97,50	2,50
L x A UV	20	100	0	0
L x A UV p	16	81,88	18,12	0

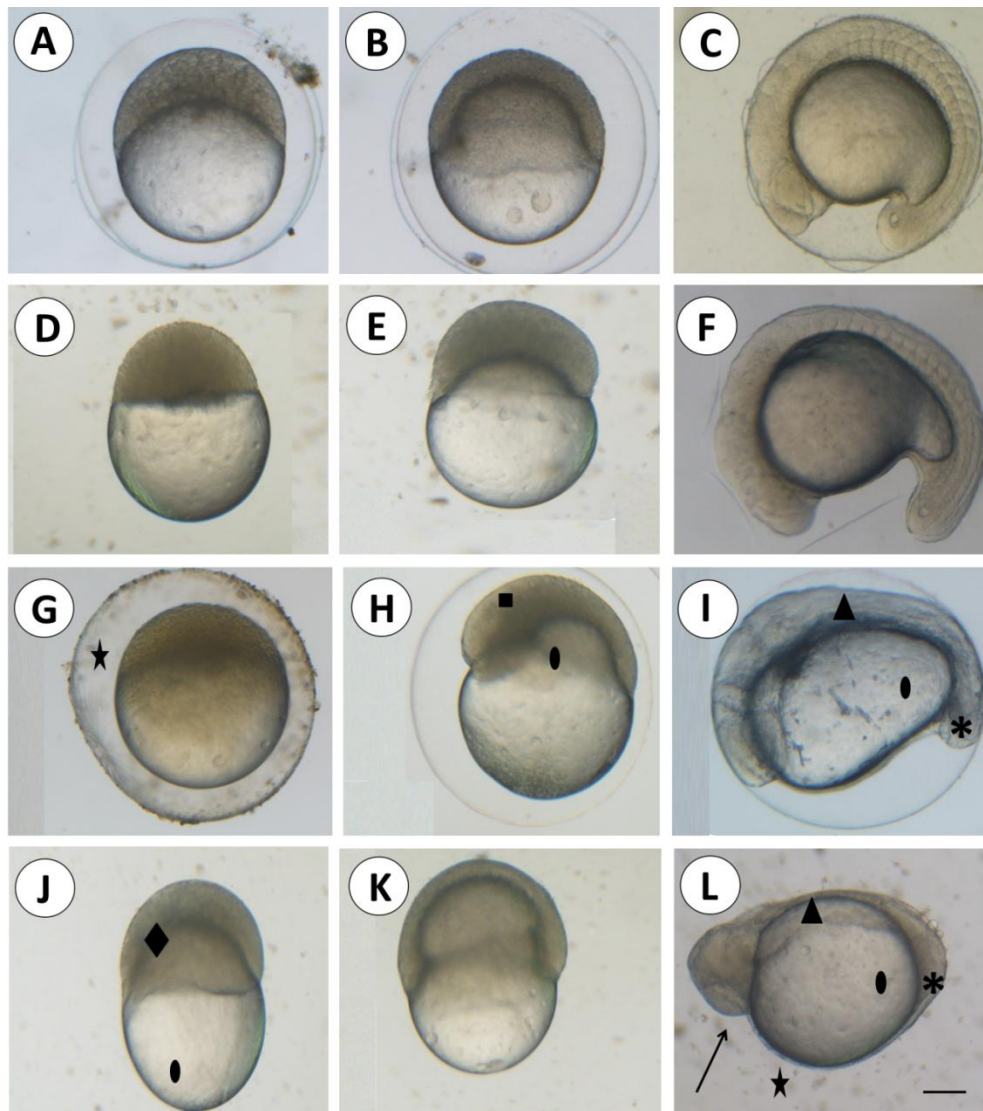


Figura 2: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, cujos oócitos foram fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C); cujo córion do oócito foi removido antes da fertilização (D, E, F); cujo oócito foi irradiado e posteriormente fertilizado (G, H, I) e cujo oócito foi irradiado, com remoção do córion, e posteriormente fertilizado (J, K, L). Asteriscos destacam malformações na região de diferenciação da cauda, setas apontam para deformidades na região cranial, estrelas células se desprendendo do embrião em divisão, círculos mal conformação no vitelo, triângulo número reduzido de somitos no mesmo período de incubação, quadrado malformações nos movimentos de epibolia do estágio de gástrula e losango malformações nas blastoderme. Barra de escala: 100 μ m.

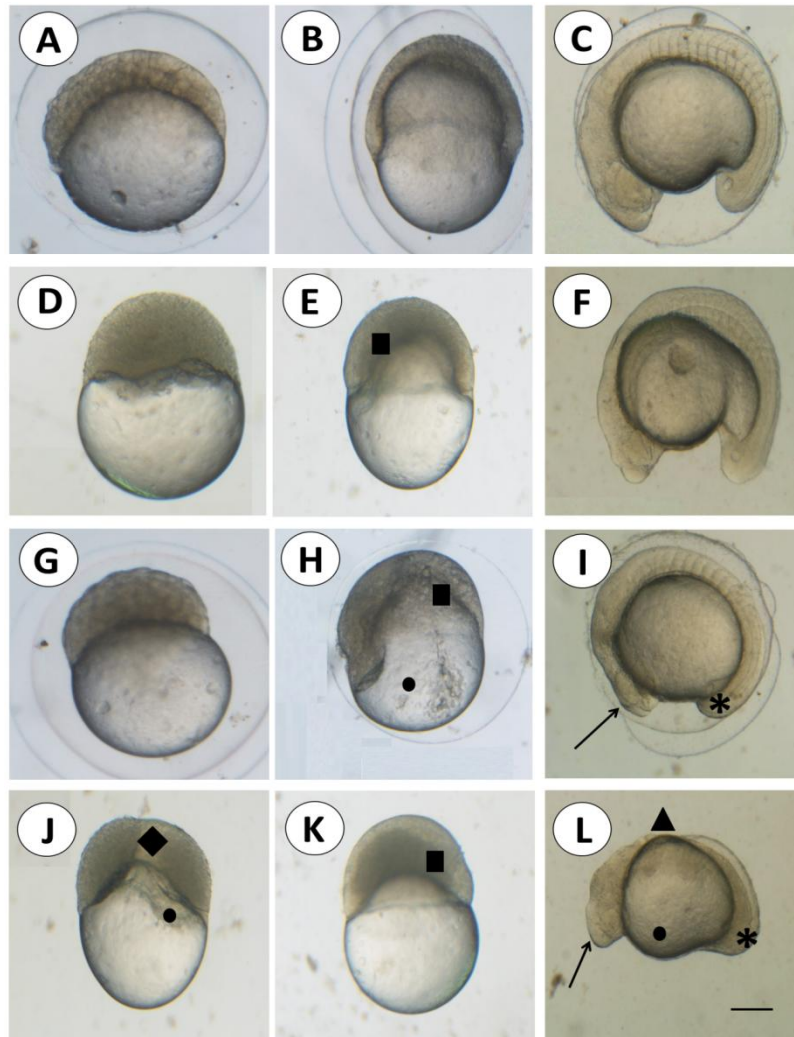


Figura 3: Desenvolvimento embrionário do híbrido de *Astyanax altiparanae* com *Astyanax fasciatus* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C); cujo córion do oócito de *A. altiparanae* foi removido antes da fertilização com sêmen de *A. fasciatus* (D, E, F); cujo oócito foi irradiado e posteriormente fertilizado com sêmen de *A. fasciatus* (G, H, I); cujo oócito foi irradiado, com remoção do córion, e posteriormente fertilizado com sêmen de *A. fasciatus* (J, K, L). Asteriscos destacam malformações na cauda, setas deformidades na região cranial, círculos malformações no vitelo, triângulo número reduzido de somitos no mesmo período de incubação, quadrado malformações nos movimentos de epibolia do estágio de gástrula e losango malformações nas divisões celulares da blastoderme. Barra de escala: 100 μ m.

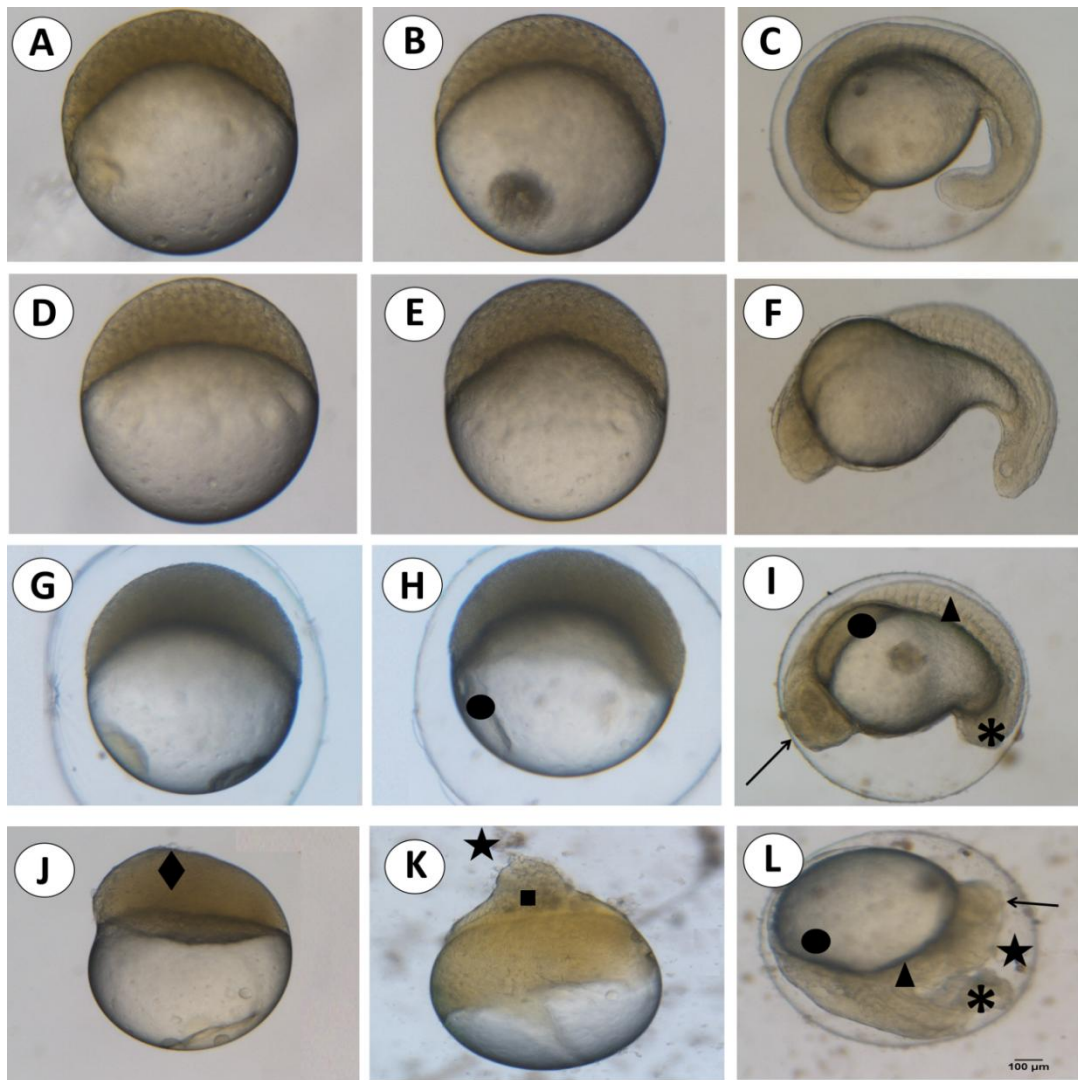


Figura 4: Desenvolvimento embrionário do híbrido de *Astyanax altiparanae* com *Hyphessobrycon anisitsi* albino nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, imediatamente fertilizados após a extrusão (A, B, C); cujo córion do oócito foi removido antes da fertilização (D, E, F); cujo oócito foi irradiado e posteriormente fertilizado (G, H, I) e cujo oócito foi irradiado, com remoção do córion, e posteriormente fertilizado (J, K, L). Asteriscos destacam malformações na cauda, setas deformidades na região cranial, estrelas células se desprendendo do embrião, círculos malformações no vitelo, triângulo número reduzido de somitos no mesmo período de incubação, quadrado malformações nos movimentos de epibolia do estágio de gástrula e losango malformações nas divisões celulares da blastoderme. Barra de escala: 100 μm .

Discussão

Os resultados sugerem um protocolo para indução de androgenéticos diploides em espécies neotropicais. A diploidia foi recuperada em dois tratamentos que receberam irradiação e foram posteriormente fertilizados. A indução de androgenéticos diploides a partir da fertilização com espermatozoides poliploides ou com mais de um espermatozoide já vem sendo estudada em outras espécies.

Yoshikawa *et al* (2008) destacam as possibilidades de fertilização de oócitos irradiados com sêmen diploide obtido de peixes tetraploides ou até mesmo de mosaicos $2n-3n$ em *Misgurnus anguillicaudatus* para produção de androgenéticos diploides. Paschos *et al* (2001) obtiveram androgenéticos diploides da espécie *Carassius auratus* a partir da irradiação dos oócitos, fertilização com sêmen haploide e choque de temperatura para inibir a primeira divisão da clivagem. Os autores destacam, no entanto, baixos índices de sobrevivência, assim como observado por Christopher *et al* (2014) aplicando a mesma metodologia na espécie *Heteropneustes fossilis*. Desta forma, a fertilização com gametas poliploides ou com mais de uma célula seria uma alternativa menos invasiva na recuperação da diploidia, principalmente considerando o fato de que o oócito já foi exposto a doses substanciais de radiação UV.

A recuperação da diploidia na indução à androgênese é fundamental para obtenção de índices satisfatórios de sobrevivência. A irradiação dos oócitos e consequente inativação do material genético materno, associada à fertilização com espermatozoide normal haploide irá gerar uma progênie haploide, com severas malformações e anormalidades que caracterizam a “Síndrome Haploide”, já descrita por Lin e Dabrowski (1998), Paschos *et al* (2001), Kirankumar e Pandian (2004) e

Christopher *et al* (2014), em trabalhos de indução à androgênese nas espécies *Esox masquinongy*, *Carassius auratus*, *Puntius conchoniis* e *Heteropneustes fossilis*, respectivamente. Os mesmos padrões de malformações foram observados nos tratamentos deste trabalho, com a fertilização de oócitos irradiados e fertilizados com sêmen das três diferentes espécies.

A recuperação do estado diploide das progênes após irradiação foi alcançada neste trabalho por meio da fertilização dos oócitos com mais de um espermatozoide, através da remoção do córion – ou decorionação – dos gametas. Este processo pode ser realizado física ou quimicamente, sendo mais eficazes os métodos de remoção química, com diversos protocolos de diferentes concentrações enzimáticas que variam entre as espécies (Henn e Braunbeck, 2011; Keivanloo e Sudagar, 2015).

Yamaha *et al* (1986) relataram remoção completa do córion na espécie *Cyprinus carpio* utilizando a enzima tripsina na concentração de 0,1%. Os autores destacaram a importância em não permanecer com os oócitos expostos à solução após a remoção completa do córion, o que poderia comprometer a morfologia e o posterior desenvolvimento embrionário. No presente trabalho, essa remoção completa foi alcançada com a enzima pronase (0,05%), atentando igualmente para o tempo de ação para não manter os gametas expostos à ação enzimática de digestão.

A técnica de decorionação já vem sendo muito explorada na biotecnologia aplicada como ferramenta para possibilitar a micromanipulação, em estudos que envolvem transplante celular (Suzuki *et al.*, 1997), produção de quimeras (Morrison, *et al.*, 2003), produção de transgênicos (Zhu *et al.*, 1985; Khoo, 1995) ou até mesmo em ensaios sobre resistência à agentes tóxicos (Mizell e Romig, 1997; Henn e Braunbeck, 2011) e desenvolvimento embrionário (Mizell e Romig, 2002; Paes *et al.*, 2013; Pereira-

Santos *et al.*, 2016). A possibilidade em controlar os mecanismos de fertilização é a maior vantagem que a técnica permite manipular (Hallerman *et al.*, 1988).

A abordagem de fertilização por mais de um espermatozoide por meio da decorronação do oócito para restaurar a diploidia da progênie dispensa os protocolos subsequentes de inibição da segunda divisão meiótica ou da primeira divisão mitótica, favorecendo um acréscimo na sobrevivência final das progênes, visto que a sobrevivência relatada nesses estudos é geralmente baixa (Komen e Thorgaard, 2007).

São inexistentes os trabalhos com remoção do córion e fertilização dispérmica em espécies nativas de peixes, sendo que o presente estudo traz, desta forma, resultados inéditos sobre esta estratégia de indução à androgênese dispérmica nas espécies *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Hyphessobrycon anisitsi* albino, com possibilidades para estruturar uma linha de pesquisa em reprodução uniparental e conservação dos recursos genéticos em espécies nativas.

Referências Bibliográficas

Arai, K.; Masaoka, T.; Suzuki, R. **Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs**. Nippon Suisan Gakkaishi 58:1197–1201. 1992.

Carrillo, M.; Chacón, M. **Ensayo de androgénesis diploide en tilápia roja mediante manipulación cromosomal**. Tesis de grado. Facultad de biología marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, 1995.

César, M. P. *et al.* **Métodos para obtenção de populações monossexo na piscicultura**. Boletim Agropecuário/UFLA - n.º 69 - p.1-27 Lavras/MG. 2006.

Christopher, J. G.; Murugesan, A. G.; Sukumaran, N. **Induction of diploid androgenesis in the stinging catfish, *Heteropneustes fossilis***. Journal of the World Aquaculture Society. 45(5), 558-566. 2014.

Clifton, J. D.; Pandian, T. J. **Dispermic induction of interspecific androgenesis in the fish, Buenos Aires tetra using surrogate eggs of widow tetra**. Current Science, 95 (1), 2008.

Hallerman, E. M.; Schneider, J. F.; Gross, M. L.; Faras, A. J.; Hackett, P. B.; Guise, K. S.; Kapuscinski, A. R. **Enzymatic Dechoriation of Goldfish, Walleye, and Northern Pike Eggs**. Transactions of the American Fisheries Society, 117:5, 456-460, 1988.

Henn, K.; Braunbeck, T. **Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*)**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 153, 91-98. 2011.

Keivanloo, S.; Sudagar, M. **Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos by DMSO – based vitrificant solutions**. Theriogenology. 85, 1013-1018. 2016.

Khoo, H. W. **Transgenesis and its applications in Aquaculture**. Asian Fisheries Science 8, 1–25. 1995.

Kirankumar, S.; Pandian, T. J. **Production and progeny testing of androgenetic Rosy Barb *Puntius conchoni***. Journal of Experimental Zoology. 301A: 938-951. 2004.

Komen, H.; Thorgaard, G. **Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review**. Aquaculture [S.I.], p. 150-173, SEP 14, 2007.

Mizell, M.; Romig, E. S. **The aquatic vertebrate embryo as a sentinel for toxins: zebrafish embryo dechoriation and perivitelline space microinjection**. International Journal of Developmental Biology 41, 411–423. 1997.

Mizell, M.; Romig, E. S. **The aquatic vertebrate embryo as a sentinel for toxins: zebrafish embryo dechoriation and perivitelline space microinjection**. International Journal of Developmental Biology, 41 (2), 411-423, 2002.

Paes, M. C. F.; Makino, L.; Vasquez, L. A.; Fernandes, J. B. K.; Valentin, F. N.; Nakaghi, L. S. O. **Induction reproduction and early development histology of *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)**. Zygote. 1, 1-10, 2013.

Pandian, T. J.; Kirankumar, S. **Androgenesis and conservation of fishes**. Current Science [S.I.], v. 85, n. 7, p. 917-931, 2003.

Paschos, I.; Natsis, L.; Nathanailides, C.; Kagalou, I.; Kolettas, E. **Induction of gynogenesis and androgenesis in goldfish *Carassius auratus* (var. oranda)**. Reprod. Dom. Anim. 36, 195-198. 2001.

Pereira-Santos, M.; Yasui, G. S.; Xavier, P. L. P.; Adamov, N. S. M.; Nascimento, N. F.; Fujimoto, T.; Senhorini, J. A.; Nakaghi, L. S. O. **Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae).** *Zygote* 1-13. 2016.

Suzuki, M.; Yamaha, E.; Yamazaki, F. **Enucleation of visualized nuclei from dechorionated fertilized eggs in goldfish.** *Fisheries Science*. 63(3), 474-475. 1997.

Yamaha, E.; Usui, K.; Onozato, H.; Hamada, K. **A method for dechoriation in goldfish *Carassius auratus*.** *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 52(11), 1929-1934. 1986.

Yoshikawa, H.; Morishima, K.; Fujimoto, T.; Arias-Rodrigues, L.; Yamaha, E.; Arai, K. **Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach: a review.** *J. Appl. Ichthyol*. 24, 410–414. 2008.

Zhu, Z., G. Li, L. He, and S. Chen. **Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758).** *Zeitschrift fuer Angewandte Ichthyologie* 1:31-34. 1985.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA / ICMBio), pelo fornecimento de toda a estrutura física, fornecimento de material biológico e suporte técnico necessários e à Capes, pelo financiamento do projeto de pesquisa em forma de bolsa de doutorado e à FAPESP (2010/17429-1 e 2011/11664-1).

Capítulo IV

Capítulo IV: Fatores que afetam a androgênese dispérmica em peixes: baixa dose inseminante aumenta índice de diploides

Sumário

Resumo.....	143
Introdução.....	144
Material e Métodos.....	146
Resultados.....	152
Discussão.....	162
Referências Bibliográficas.....	165
Agradecimentos.....	167

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de indução à androgênese dispérmica em *Astyanax altiparanae* através da fertilização com sêmen fundido. O sêmen fundido teve a sua viabilidade avaliada e parâmetros relacionados a morfologia e ultraestrutura foram observados por meio de microscopia eletrônica de varredura. Para fertilização, foram estabelecidos cinco tratamentos: um controle com o dobro da dose inseminante necessária, sem passar pelo protocolo de fusão e com oócitos não irradiados (1), o dobro da dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (2), cinco vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (3), dez vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (4) e cem vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (5). Os oócitos foram enucleados por irradiação UV por 90 segundos. A ploidia foi avaliada por citometria de fluxo. O protocolo utilizado para fusão dispérmica apresentou 95,5% de viabilidade (células vivas) e a fusão se estendeu da região da cabeça até o flagelo. A microscopia eletrônica apontou a ocorrência de agregados de espermatozoides e fusão com células sem flagelo. O tratamento com sêmen fundido em menor concentração de dose inseminante (2) apresentou percentual de fertilização de 39,08%, com eclosão de 40,06%. Destacou-se um percentual de eclosão de larvas normais de 34,13% nesse tratamento. Além disso, o tratamento 2 também apresentou o maior índice de indivíduos diploides, com 33,33%. Os resultados apontam para um protocolo de indução à androgênese dispérmica na espécie, sugerindo que apesar da fertilização ser menor em tratamentos com dose inseminante reduzida, o percentual de indivíduos diploides é maior, devido a possibilidade de fertilização com mais espermatozoides fusionados. O

protocolo pode ser aplicado em estudos de conservação dos recursos genéticos e manipulação cromossômica em espécies nativas.

Palavras-chave: Espermatozoide, fertilização, fusão, irradiação, ultraestrutura.

Introdução

Em peixes, a produção de androgenéticos pode ser viável através da introdução de um ou mais espermatozoides de uma espécie em oócitos com material genético inativado por irradiação UV, ou até mesmo por supressão da primeira divisão mitótica dos embriões. A técnica pode ser empregada como ferramenta de propagação mediada, através da utilização de oócitos inativados de espécies filogeneticamente próximas.

Essa manipulação cromossômica torna-se um processo muito mais facilitado com estes modelos de vertebrados, uma vez que são capazes de tolerar uma diversidade de genomas múltiplos, provenientes unicamente de genoma materno, paterno ou até mesmo de espécies parentais (Kirankumar e Pandian, 2004; Clifton e Pandian, 2008).

A diploidia da progênie androgenética é necessária para garantir a sobrevivência dos embriões e consequente viabilidade do protocolo. Usualmente, uma das metodologias utilizadas com esse objetivo é através da supressão da primeira divisão da clivagem dos embriões fertilizados, dando origem a diploides androgenéticos homozigóticos (Parsons e Thorgaard, 1985; Komen e Thorgaard, 2007).

No entanto, a viabilidade deste protocolo geralmente é baixa, devido a uma série de fatores, como a expressão homozigótica de genes recessivos letais e a agressividade do tratamento de choques de temperatura para inibição da primeira clivagem, logo em seguida à exposição dos oócitos a radiação para inativar o material genético (Scheerer *et al.*, 1986).

Desta forma, outra abordagem alternativa pode ser através da fertilização dos oócitos com mais de um espermatozoide, possível através da utilização de sêmen de indivíduos tetraploides (Thorgaard *et al.*, 1990). A utilização de machos tetraploides na indução de androgenéticos diploides já vem sendo bem explorada em algumas espécies de teleósteos, como *Misgurnus anguillicaudatus* (Yoshikawa *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2013). Contudo, uma série de estudos prévios deve ser desenvolvida para que se possa adotar essa técnica com sucesso, como a padronização de protocolos de produção de indivíduos popliplóides, que devem ser estudados e estabelecidos para cada espécie.

A fusão dispérmica e posterior fertilização pode ser uma nova alternativa nesse propósito. Menos agressivo, o protocolo pode dar origem a uma progênie de indivíduos androgenéticos diploides com material genético exclusivamente paterno. Essa fusão de espermatozoides pode ter variações de protocolos por ser muito espécie-específica e devendo, portanto, ser investigada para cada espécie de interesse.

Araki *et al.* (1995), por exemplo, relataram um protocolo de fusão dispérmica na espécie *Oncorhynchus mykiss* com 85 mM de CaCl₂. Yasui *et al.* (2012), no entanto, relataram concentrações de 2,5 mM de íons de cálcio e magnésio como soluções eficazes na indução da fusão dispérmica na espécie *Misgurnus anguillicaudatus*. Apesar de serem escassos os estudos realizados com a finalidade de elucidar estes protocolos, o caracádeo *Astyanax altiparanae* possui um protocolo de sucesso na indução da fusão

dispérmica, através de concentrações de $MgCl_2$ (Spandri, 2014), o que torna possível a utilização do protocolo de produção de androgenéticos diploides na espécie.

Desta forma, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de padronizar um protocolo eficaz de indução de androgenéticos diploides na espécie *Astyanax altiparanae* por meio de inativação do material genético materno com irradiação UV e posterior fertilização com sêmen fundido da espécie, padronizando uma dose inseminante ideal após fusão com maior índice de indivíduos diploides entre a progênie.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no uso de Animais do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEUA / CEPTA # 02031.000007/2016- 65).

Indução a reprodução e coleta dos gametas

Foram utilizadas fêmeas maduras da mesma idade, aptas para a reprodução através de características como abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada e tamanho e coloração uniforme dos oócitos.

Após esta seleção prévia, os animais foram transferidos para ambientes de temperatura controlada (28°C) e receberam tratamento hormonal para indução a reprodução, com hormônio sintético Ovopel ® (D-Ala, Pro-Net-mGnRH) (Unic-trade,

Hungria), na concentração de 3mg kg^{-1} , em dose única. Após aproximadamente seis horas, os animais foram transferidos para solução anestésica de mentol para os procedimentos de extrusão artificial e coleta dos oócitos, que foram transferidos para placa de Petri de plástico de 100 mm coberta com uma película de plástico, em ambiente de temperatura controlada a 26°C (ver Pereira – Santos *et al.*, 2016).

O sêmen foi coletado de machos maduros, da mesma idade das fêmeas, após tratamento com o mesmo protocolo de indução hormonal. Com cerca de seis horas de ação do hormônio, os mesmos foram separados e transferidos para solução anestésica de mentol para o procedimento de coleta. O sêmen foi coletado utilizando uma micropipeta de 1000 μL Eppendorf (Eppendorf, Alemanha) e imediatamente transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 400 μl de solução de Ringer modificado (NaCl 128,3 mM, KCl 23,6 mM, CaCl_2 3,6 mM, MgCl_2 2,1 mM) sendo, em seguida, mantido a $2,5^{\circ}\text{C}$. A qualidade espermática foi mensurada com base na motilidade dos espermatozoides (ver Yasui *et al.*, 2009, 2012), e apenas amostras apresentando motilidade progressiva acima de 80% foram utilizadas para os ensaios de fertilização.

Fusão dispérmica

Para fusão dos espermatozoides, foi utilizado o protocolo estabelecido por Spandri (2014). A amostra de sêmen foi ativada com uma diluição de 20X com água destilada, coberta com lamínula própria e a motilidade foi observada em microscópio Nikon Ci, Tóquio, Japão. Sequências de vídeo foram tomadas utilizando-se uma câmera tipo CCD (Nikon DsF1, Tóquio, Japão) conectada a um software de captura de imagens (Nikon Nis-Ar Elements, Tóquio, Japão).

A concentração espermática também foi mensurada utilizando-se hemocitômetro. Cinco amostras com motilidade progressiva acima de 80% e concentração acima de $8,4 \times 10^8$ spz mL⁻¹ foram selecionadas para os testes de fusão espermática. As amostras foram diluídas com solução de Ringer modificada de modo que a concentração final fosse de 7×10^8 em 250µl.

O sêmen foi analisado separadamente para a observação da motilidade espermática (%) em uma Câmara de Makler. Após a diluição, foram utilizados 10 µl do sêmen e misturado com 10 µl de solução de 60 mM de MgCl₂, por 10 minutos a 25°C, e posteriormente foram mensurados os parâmetros espermáticos.

Viabilidade espermática

Após a determinação da concentração e motilidade espermática e da realização do protocolo de fusão dispérmica, a viabilidade espermática foi analisada de uma amostra fresca e de uma amostra com fusão, em citômetro de fluxo BD Accuri C6 (EUA). Para cada 50 µL de amostra de sêmen, foram adicionados 0,2 µL de SyBR Green (Sigma #S9430) e 0,4 µL de iodeto de propídio (Sigma #P4170), para pigmentação das células vivas e mortas.

Pela conjugação dos reagentes utilizados, foi possível distinguir duas populações de espermatozoides: viáveis (vivos) e células mortas. O percentual foi quantificado pela citometria, gerando os gráficos de viabilidade espermática.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do sêmen fundido

O material foi encaminhado para a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) para processamento do material em microscopia eletrônica de Varredura (MEV). As amostras previamente fixadas em solução de 2,5% de glutaraldeído + PBS foram pós – fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas, lavadas em tampão de sódio fosfato pH 7,4 e desidratadas em séries graduais de etanol. Em seguida, as amostras foram secas no ponto crítico em secador de CO₂ líquido, montadas em *stubs* e revestidas em íons de ouro paládio (DENTON Vacumm Desk II) e subsequentemente observadas e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol-JSM 5410, Akishima, Tokyo, Japão).

Fertilização e desenvolvimento embrionário

A Figura 1 esquematiza a metodologia realizada nas etapas de coleta dos gametas e fertilização normal e dispérmica de *Astyanax altiparanae*. Para cada tratamento, 50 µL de oócitos (aproximadamente 280 oócitos) foram separados para fertilização. Considerando a dose inseminante previamente estabelecida para a espécie *Astyanax altiparanae* por Pereira-Santos (2014) de 2390 espermatozoides por mL⁻¹, estimou-se a dose para fertilização ideal dos 50 µL de oócitos a partir da concentração do sêmen coletado. A partir desses valores, adaptou-se a concentração espermática para o protocolo de fusão (7×10^8), considerando uma diluição em 250 µL.

Assim, foram estabelecidos então os cinco tratamentos de fertilização: um controle com o dobro da dose inseminante necessária, sem passar pelo protocolo de fusão e com oócitos não irradiados (1), o dobro da dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (2), cinco vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (3), dez vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (4) e cem vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (5).

Após a fertilização em cada tratamaneto, o desenvolvimento embrionário foi acompanhado por meio de estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japão) e imagens digitais tomadas através de uma câmera CCD (Nikon DS-F1, Nikon, Toktyo, Japan) empregando-se o software Nis-Ar Elements (Nikon, Tokyo, Japan), durante os estágios de fertilização, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão. As larvas eclodidas foram classificadas como normais ou anormais de acordo com os parâmetros estabelecidos por Pereira-Santos *et al* (2016).

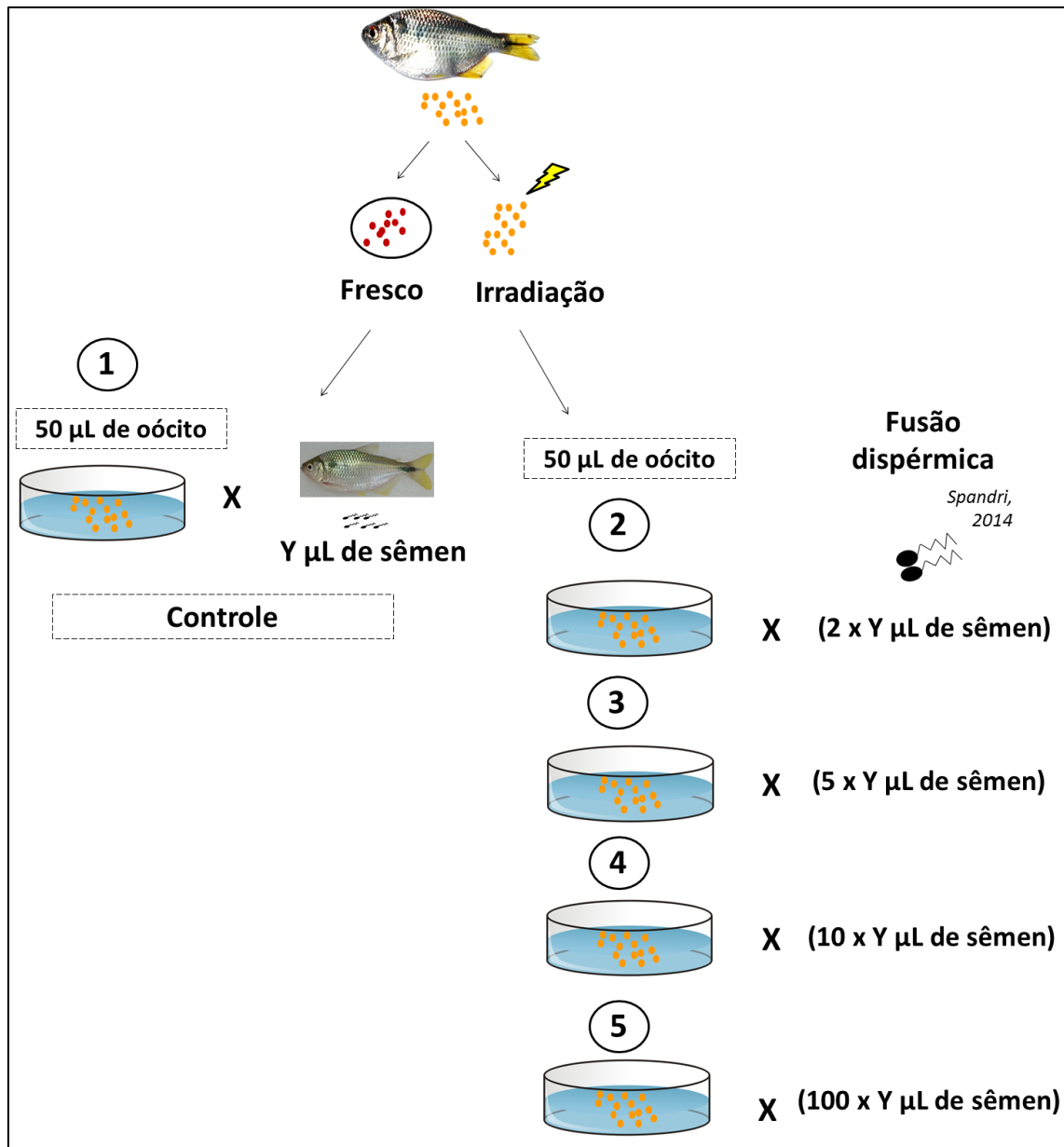


Figura 1: Esquema da metodologia de fertilização dos oócitos com sêmen haploide normal e com sêmen fundido.

Citometria de fluxo

As larvas recém-eclodidas foram transferidas para microtubo de 1,5 mL contendo 120 μL de solução de lise. As amostras foram incubadas à temperatura

ambiente durante 30 minutos com agitação em vortex por intervalos de 5 minutos e coradas com adição de 800 μL de Dulbecco's PBS (Sigma #D5773) contendo 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de corante DAPI. As amostras foram então filtradas por peneira de 30 μm (Celltrics, Partec, Germany) e analisadas por citômetro de fluxo Partec CyFlow Ploidy Analyzer (Partec GmbH, Alemanha) com filtro específico DAPI (358 nm). Foi utilizado um kit comercial adotado para análises em aquicultura e agricultura (Partec CyStain DNA 2-step, Partec GmbH, Alemanha).

Estatística

Os dados são apresentados como média \pm EP (erro padrão). Todos os experimentos foram realizados em três repetições, usando diferentes fontes de oócitos. Os dados foram verificados quanto à normalidade utilizando o teste Liliefors, em seguida, comparados usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey (0,05). O software Statistica 11 foi utilizado para a análise estatística.

Resultados

A viabilidade do sêmen utilizado antes e depois do protocolo de fusão é apresentada na Figura 2. O sêmen apresentou concentração de $9,2 \times 10^8$ espermatozoides por mL^{-1} . A análise de viabilidade destacou percentual de 94,4 % de células vivas e 1,9% de células mortas (Figs. 2A, C). Após o procedimento de fusão, a

viabilidade manteve-se satisfatória, com 96% de células vivas e 1,5% de células mortas, evidenciando que o protocolo não afeta a viabilidade espermática (Figs. 2B,D).

A análise em microscopia eletrônica de varredura evidenciou a ultraestrutura e fusão dos gametas. Foi possível evidenciar como a aplicação do protocolo afeta a morfologia celular e, conseqüentemente, o potencial de fertilização. O protocolo de fusão dispérmica foi eficaz para a espécie, com muitas células apresentando fusão (Figura 3). Os espermatozoides agregaram-se entre si a partir da cabeça até a extensão dos flagelos (Figs 3A, B) ou apenas pela cabeça (Figs. 3C, D).

Alguns aspectos desfavoráveis ao objetivo do protocolo de fusão, no entanto, foram descritos (Figura 4). Destacou-se que a fusão pode promover adesão entre mais de duas células, dificultando a fertilização (Figs. 4 A, B). Além disso, células com malformações ou deformidades podem se agregar a células viáveis normais, o que também pode contribuir na redução da fertilização. Foi possível destacar fusão de espermatozoides viáveis com outros que não apresentavam flagelo (Fig. 4C).

Dependendo da concentração espermática, a fusão pode provocar a formação de “grumos” de células, com muitos espermatozoides fundidos. Esse evento pôde ser observado, com pouca frequência, no protocolo utilizado (Fig. 4D). A fusão também pode ocorrer em pontos diferentes entre cada espermatozoide e envolver mais de duas células (Fig. 4E). Por fim, é importante destacar que a aplicação do protocolo de fusão, apesar de eficaz, não é completa.

Alguns espermatozoides permanecem isolados após a fusão (Fig. 4F), justificando a importância do estabelecimento de uma dose inseminante para fertilização, visto que estas células isoladas terão maior motilidade e conseqüente potencial para fertilizar um oócito que poderia ser fertilizado por duas células fundidas,

com motilidade inferior. A reunião destes aspectos analisados na ultraestrutura pode justificar a baixa fertilização dos oócitos por sêmen fundido.

A análise do desenvolvimento embrionário apresentou índices satisfatórios de sobrevivência em todos os tratamentos (Figura 5). A fertilização foi aumentando gradativamente conforme o aumento da dose inseminante em cada tratamento, chegando próxima ao controle. A menor dose inseminante, correspondente ao tratamento 2, apresentou o menor percentual de fertilização, com diferença significativa entre os demais tratamentos ($P = 0,05$) (Tabela1).

No estágio de blástula, o tratamento 2, com o dobro da dose inseminante de sêmen fundido, continuou a apresentar sobrevivência inferior com relação ao controle (tratamento 1) e ao tratamento 5, com cem vezes a dose inseminante ($P=0,08$). Essa sobrevivência inferior aos dois tratamentos se justifica pelo fato da fusão provocar uma queda na motilidade espermática e consequente capacidade de fertilização, em comparação com sêmen fresco não fusionado (controle). Ela também é inferior ao tratamento 5, uma vez que o incremento em cem vezes da dose inseminante necessária após fusão aumenta a possibilidade de fertilização de mais oócitos. Mesmo assim, todos os tratamentos analisados apresentaram eclosão.

A citometria de fluxo realizada entre as larvas provenientes de cada tratamento destacou um percentual de 33,33% de larvas diploides no tratamento 2 (Tabela 2). Os tratamentos 3, 4 e 5, apresentaram, respectivamente, 4,44; 5,00 e 4,17% de larvas diploides após a fertilização dos oócitos irradiados com sêmen fundido. A relação entre as análises do desenvolvimento embrionário e a ploidia por citometria de fluxo após eclosão evidenciaram que a fertilização aumenta conforme o acréscimo da dose

inseminante, mas que o percentual de embriões diploides é inversamente proporcional ao aumento dessa dose.

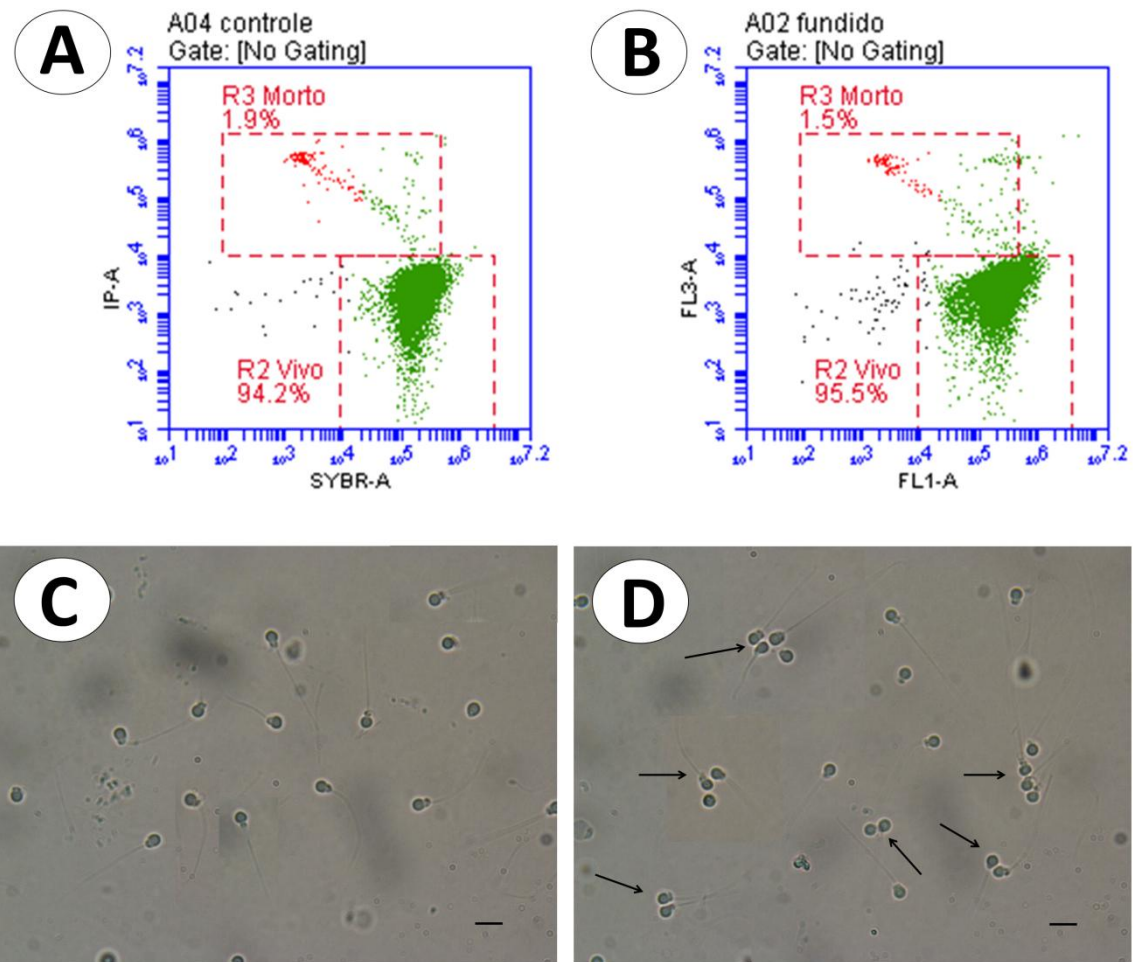


Figura 2: Viabilidade do sêmen de *Astyanax altiparanae* antes e após do protocolo de fusão. Viabilidade espermática antes da aplicação do protocolo (A) e após a aplicação do protocolo (B). Análise da motilidade espermática em microscopia de luz, antes da aplicação do protocolo (C) e após a aplicação do protocolo de fusão (D). Setas indicam espermatozoides com fusão. Barra de escala: 1 μ m.

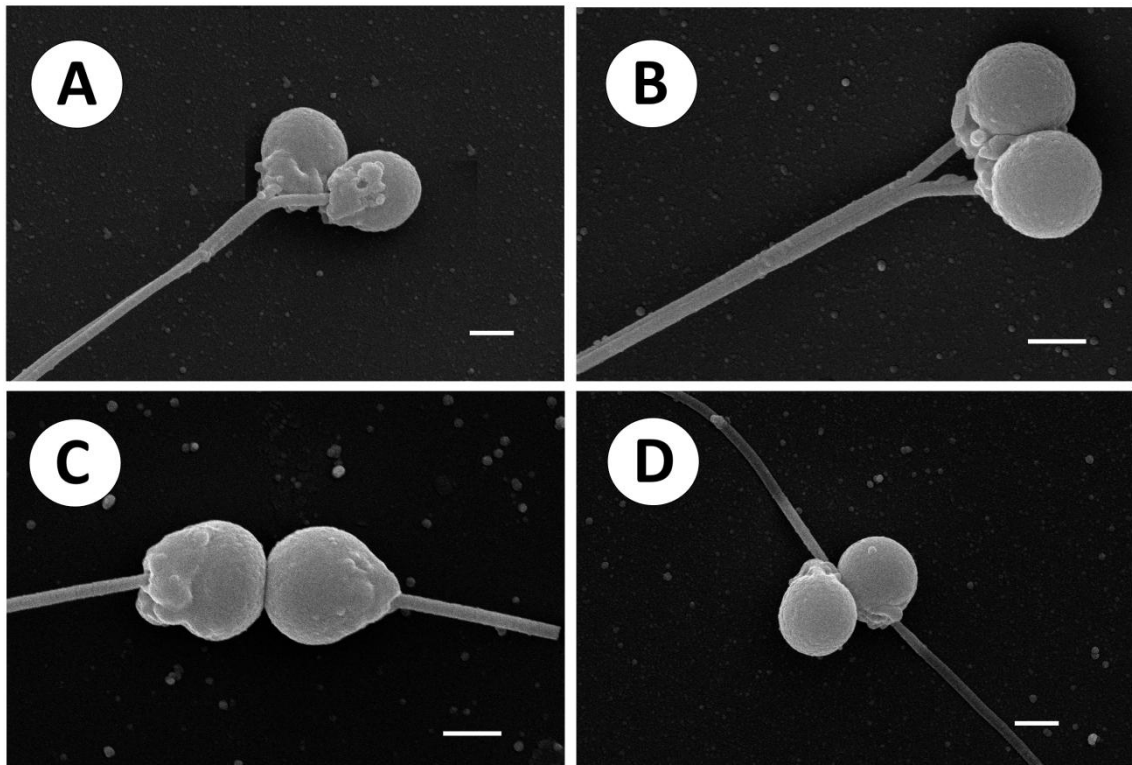


Figura 3: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do sêmen de *Astyanax altiparanae* após protocolo de fusão dispérmica, evidenciando os locais de adesão entre os gametas. Fusão a partir da cabeça se estendendo por todo o flagelo (A, B) e fusão pela cabeça (C, D). Barra de escala: 1 µm.

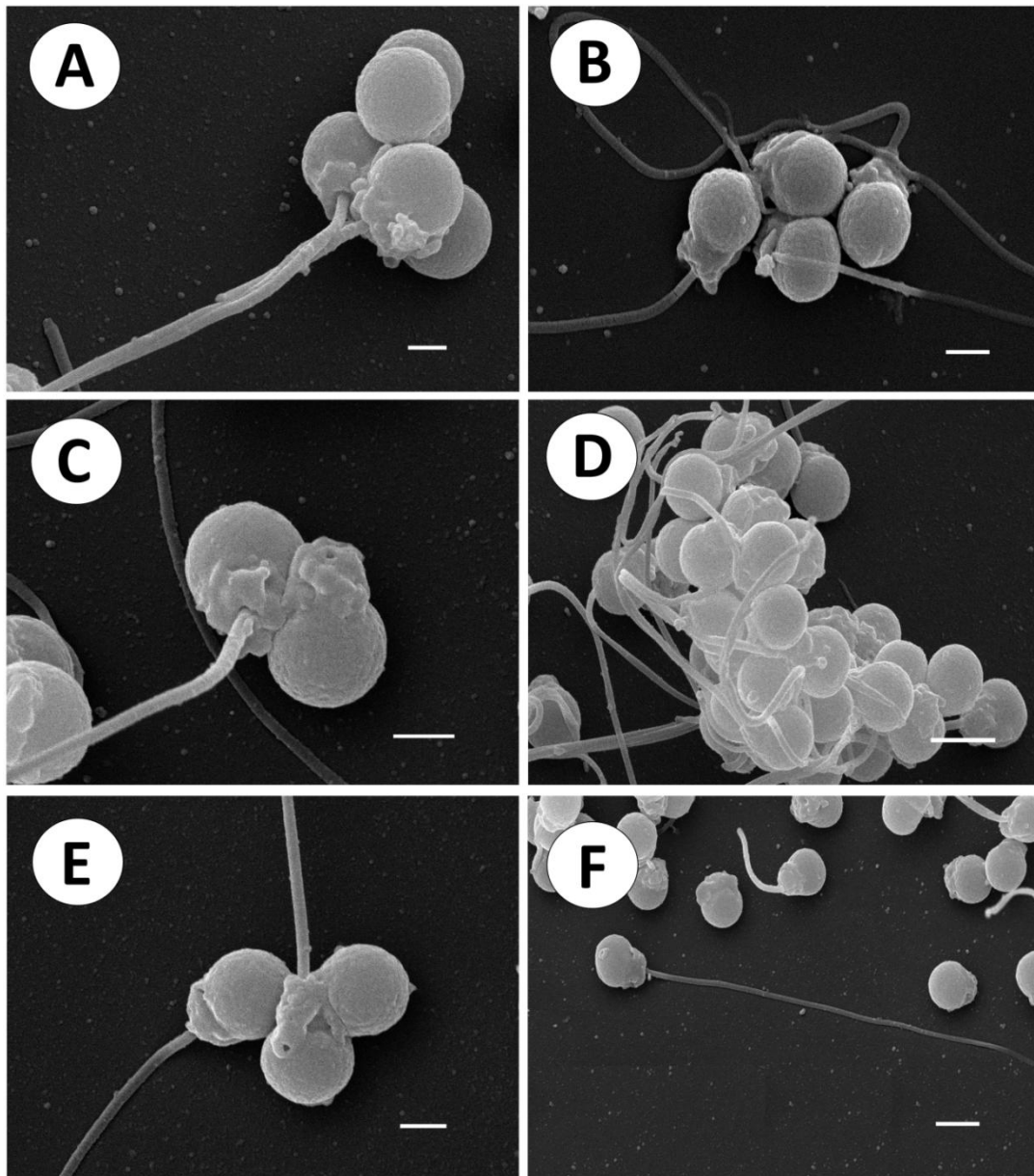


Figura 4: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do sêmen de *Astyanax altiparanae* após protocolo de fusão. A indução à fusão pode provocar agregação de mais de duas células (A, B), bem como fusão de espermatozoides viáveis com células anormais, apresentando aspectos como ausência de flagelo (C), junção de um grupo de células próximas, formando “grumos” (D), ou de mais de duas células com espermatozoides sem flagelo (E). O protocolo não garante a fusão total de todos os espermatozoides, sendo possível individualizar algumas células isoladas (F). Barra de escala: 1 μ m.

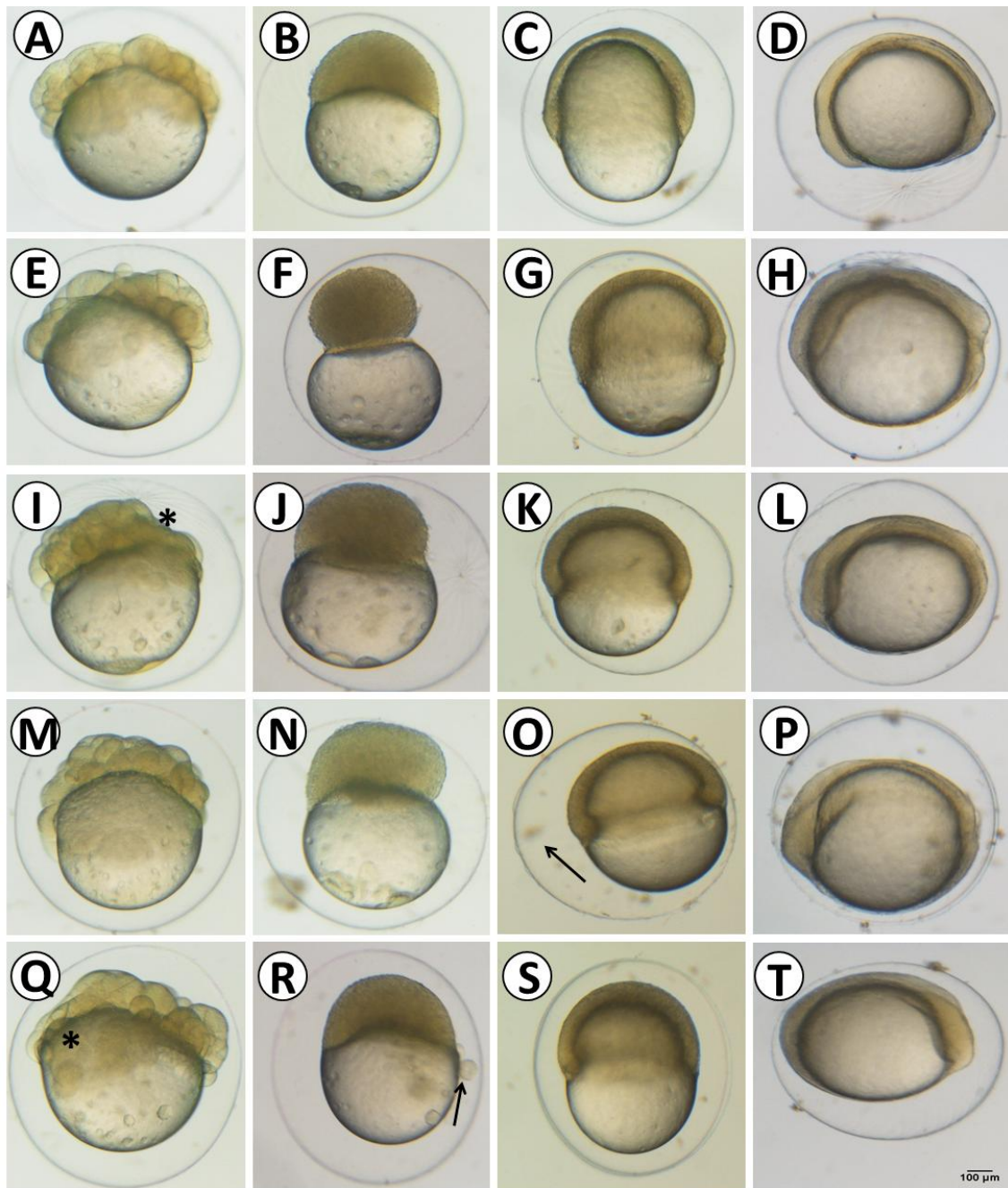


Figura 5: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de clivagem, blástula, gástrula e segmentação, respectivamente, em cada um dos cinco tratamentos de fertilização. Em A, B, C e D, controle (tratamento 1); em E, F, G e H, tratamento 2; em I, J, K e L, tratamento 3; em M, N, O e P, tratamento 4; e em Q, R, S e T, tratamento 5. Asteriscos indicam divisões celulares irregulares no estágio de clivagem e setas destacam células mortas se desprendendo do embrião. Barra de escala: 100 µm.

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* ao longo dos cinco tratamentos de fusão. **Legenda:** controle com o dobro da dose inseminante necessária, sem passar pelo protocolo de fusão e com oócitos não irradiados (**1**), o dobro da dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (**2**), cinco vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (**3**), dez vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (**4**) e cem vezes a dose inseminante com sêmen fundido em oócitos irradiados (**5**).

	N° de ovos	Estágios do Desenvolvimento (%)							
		Não Fert.	Clivagem	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclusão	Normais	Anormais
1	276	0,92±0,75 ^a	99,08±0,75 ^a	98,35±1,30 ^a	90,79±6,33	91,09±2,95	71,75±7,31	96,99±0,38	3,01±0,38
2	267	60,92±7,44 ^b	39,08±7,44 ^b	70,87±8,66 ^b	73,35±8,45	61,88±10,36	40,06±25,53	34,13±19,26	65,87±19,26
3	256	13,40±6,67 ^a	86,60±6,67 ^a	91,26±5,71 ^{ab}	79,19±8,24	67,86±7,71	27,02±17,32	35,59±29,18	64,41±29,18
4	266	2,96±1,12 ^a	97,04±1,12 ^a	94,92±3,56 ^{ab}	70,37±13,38	59,31±20,15	28,70±15,60	32,37±31,03	67,63±31,03
5	258	1,34±0,75 ^a	98,66±0,75 ^a	97,04±2,33 ^a	90,54±8,2	84,98±7,59	65,48±19,05	65,27±32,64	34,73±32,64

	N° de larvas	Ploidia (%)	
		1n	2n
1 - Controle	20	0	100
2 - 2 x DI	9	66,67	33,33
3 - 5 x DI	12	95,56	4,44
4 - 10 x DI	20	95,00	5,00
5 - 100 x DI	19	95,83	4,17

Tabela 2: Citometria de fluxo das larvas de *Astyanax altiparanae* provenientes dos cinco tratamentos. **Legenda: DI:** Dose Inseminante.

Discussão

O presente estudo permitiu estabelecer um protocolo de indução à androgênese dispérmica na espécie *Astyanax altiparanae*, a partir de irradiação UV dos oócitos e fertilização com sêmen fundido. A fusão espermática em espécies de peixes teleósteos é pouco estudada na literatura, mesmo tendo uma vasta possibilidade de aplicações para manipulação cromossômica.

Alguns estudos destacam a eficiência de aplicação de cátion divalentes para indução à fusão dispérmica em algumas espécies. Em *Misgurnus anguillicaudatus*, soluções de 1,25 mM de magnésio e cálcio apresentaram agregamento de células e fusão espermática (Yasui *et al.*, 2012). Os resultados são semelhantes ao observado por Spandri (2014) para *Astyanax altiparanae*, onde a fusão ocorreu em solução de 80 mM de cloreto de magnésio e cujo protocolo foi utilizado no presente estudo.

Araki *et al* (1995) também relatam a eficácia de aplicação de cátions divalentes na indução à fusão dispérmica em peixes. Os autores obtiveram percentuais de fusão utilizando soluções de 85 mM de cloreto de cálcio em gametas da espécie *Oncorhynchus mykiss*. A utilização de soluções de cálcio como indutores de fusão espermática também foi testada com sucesso por Ueda *et al* (1988) na espécie *Oncorhynchus mykiss*, associado à um pH mais elevado.

No entanto, outros estudos apontam que os protocolos de fusão dispérmica podem sofrer variações e são espécie-específicos. Clifton e Pandian (2008) destacam resultados satisfatórios na indução à fusão dispérmica na espécie *H. caudovittatus* com soluções de 2,5% de polietilenoglicol. Esses resultados foram semelhantes ao observado

por Kirankumar e Pandian (2004), que relatam o uso de polietilenoglicol a 1% na fusão espermiática da espécie *Puntius conchoni*.

O polietilenoglicol também apresentou resultados satisfatórios em concentrações mais elevadas, como destacado por Nagoya *et al* (2010) na espécie *Oncorhynchus masou ishikawae*. Os autores relataram uma concentração de 50% da solução para indução à fusão dispérmica. Estes resultados, que contrastam com o descrito por Araki *et al* (1995) para *Oncorhynchus mykiss*, deixam mais evidente a especificidade do protocolo à cada espécie, mesmo quando se trata do mesmo gênero.

Além da fusão em si, outros parâmetros devem ser levados em consideração para o estabelecimento de um protocolo específico. Fatores como motilidade antes e após a fusão, integridade da célula e viabilidade devem ser igualmente avaliados (Yasui *et al.*, 2012; Spandri, 2014). O presente estudo pôde destacar a ocorrência de agregados celulares e alterações na ultraestrutura dos espermatozoides, como ausência de flagelo. Essas características podem afetar diretamente a fertilização posterior, e nesse sentido a dose inseminante deve ser sempre levada em consideração.

Os resultados de Spandri (2014) mostram que ainda é possível haver fecundação dos oócitos pelos espermatozoides fundidos, mesmo observando uma queda na motilidade pós fusão. Esses dados foram corroborados com os resultados do presente estudo, onde foi possível observar fertilização e eclosão em todos os tratamentos de fertilização com sêmen fundido, apesar das alterações pontuais na morfologia e ultraestrutura descartadas pela microscopia eletrônica.

Araki *et al* (1995) também relatam baixo índice de fertilização com sêmen fundido na espécie *Oncorhynchus mykiss*. Os autores apontam que a principal causa da fertilização comprometida foi a motilidade espermiática, que caiu consideravelmente

entre as células fundidas em relação às intactas. A fertilização por sêmen fundido foi avaliada através da ocorrência de embriões diploides após fertilização de oócitos enucleados por irradiação, assim como no presente trabalho.

A citometria de fluxo realizada após eclosão das larvas em cada tratamento apontou índices de androgênicos diploides em potencial nos quatro tratamentos testados. O percentual de diploides foi inversamente proporcional à dose inseminante, aumentando conforme sua menor concentração. Esse resultado corrobora a hipótese levantada com o observado na fertilização dos tratamentos, de que uma dose inseminante menor favorece a fertilização por espermatozoides fundidos.

Nagoya *et al* (2010) destacam um percentual de fertilização com sêmen fundido de 53,3% na espécie *Oncorhynchus masou ishikawae* com oócitos enucleados por irradiação. O percentual de eclosão observado nesse estudo foi de apenas 0,22%. No presente estudo, foram observados resultados mais promissores no tratamento que apresentou maior percentual de indivíduos diploides, com 39,08% de fertilização e 40,06% de eclosão.

Neste tratamento, obteve-se um percentual de 33,33% de indivíduos diploides após fertilização com sêmen fundido de oócitos enucleados por irradiação UV. O protocolo mostrou-se mais eficaz em sobrevivência e incidência de indivíduos diploides quando comparado ao relatado na literatura indexada com enucleação por irradiação UV e choque de temperatura para inibir a primeira clivagem e restaurar a diploidia.

Adotando essa segunda metodologia, Nagoya *et al* (2010) destacam um percentual de eclosão de apenas 0,09% na espécie *Oncorhynchus masou ishikawae*, sendo que o controle (sem irradiação e sem choque de temperatura) apresentou percentual de 94,4% de eclosão. Os autores, que realizaram a indução à androgênese

dispérmica pelos dois métodos – fertilização com sêmen fundido e por choque de temperatura para inibir a primeira divisão mitótica – também chegam à conclusão de que a primeira abordagem é mais eficiente e menos agressiva.

Os resultados obtidos com o presente estudo apontam para o estabelecimento da técnica de indução à androgênese dispérmica através da fertilização com sêmen fundido, com percentual de sobrevivência e viabilidade satisfatório em comparação com os dados relatados na literatura indexada.

Referências Bibliográficas

Araki, K., Shinma, H., Nagoya, H., Nakayama, I., Onozato, H. **Androgenetic diploids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced by fused sperm.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 892-896. 1995.

Clifton, J. D., Pandian, T. J. **Dispermic induction of interspecific androgenesis in the fish, Buenos Aires tetra using surrogate eggs of widow tetra.** Current Science, 95(1), 64-74. 2008.

Hou, J., Fujimoto, T., Yamaha, E., Arai, K. **Production of androgenetic diploid loach by cold-shock of eggs fertilized with diploid sperm.** Theriogenology. 80, 125-130. 2013.

Kirankumar, S. Pandian, T. J. **Interspecific androgenetic restoration of rosy barb using cadaveric sperm.** Genome, 47, 66–73. 2004.

Nagoya, H.; Kawamura, K.; Ohta, H. **Production of androgenetic amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* with dispermy fertilization.** Fish Sci. 76, 305-313. 2010.

Parsons, J. E., Thorgaard, G.H. **Production of androgenetic diploid rainbow trout.** J. Hered. 76: 177-181. 1985.

Scheerer, P.B., Thorgaard, G.W., Allendorf, F.W., Knudsen, K.L. **Androgenetic rainbow trout produced using inbred and outbred sperm sources show similar survival.** Aquaculture, 57: 289-298. 1986.

Spandri, V. C. **Indução de fusão dispérmica em lambari do rabo amarelo, *Astyanax altiparanae*.** Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária. Universidade Anhembi Morumbi. 18p. 2014.

Thorgaard, G.H., Scheerer, P.D., Hershberger, W.K., Myers, J.M. **Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival.** Aquaculture, 85: 215-221. 1990.

Ueda, T., Sato, R., and Kobayashi, J. 1988. **Triploid rainbow trout induced by high-pH, high-calcium.** Nippon Suisan Gakkaishi, 54. 1988.

Yasui, G., S; Arias-Rodriguez, L.; Fujimoto, T.; Arai, K. **Effects of ions and cryoprotectants on sperm motility and fertilization success in loach *Misgurnus anguillicaudatus*.** Aquaculture, 344-349: 147-152, 2012.

Yoshikawa, H., Morishima, K., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., Yamaha, E., Arai, K. **Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: a review.** Journal of Applied Ichthyology . 24, 410-414. 2008.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA / ICMBio), pelo fornecimento de toda a estrutura física, fornecimento de material biológico e suporte técnico necessários. À Capes, pelo financiamento do projeto de pesquisa em forma de bolsa de doutorado e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pelas análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRP/USP. Ao Centro de Aquicultura da Unesp, em Jaboticabal/SP e ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, em Jaboticabal/SP. Agradecemos também à FAPESP (2010/17429-1 e 2011/11664-1).

Considerações Finais

O trabalho desenvolvido ao longo de quatro anos e reunido aqui como tese de doutorado é o resultado de pesquisas aplicadas, estudos constantes, da preocupação sempre presente pelo refinamento dos dados e, acima de tudo, de uma parceria valiosa que envolveu professores, pesquisadores e alunos dos mais diversos níveis e áreas de formação.

Os dados apresentados são, portanto, resultados de refinamento e aprimoramento constantes das pesquisas realizadas que, compiladas, representam um valioso pacote tecnológico de manipulação cromossômica na espécie *Astyanax altiparanae*, que pode ser adaptado e servir de base para o aprimoramento de estudos em espécies nativas.

A irradiação UV dos oócitos seguida por fertilização e choque de temperatura para inibir a primeira divisão mitótica é uma técnica mais usual na indução à androgênese. O protocolo não foi apresentado neste trabalho porque mostrou-se inviável com a espécie *Astyanax altiparanae*. Foram realizadas três repetições seguindo essa metodologia, sem observar sobrevivência após a aplicação do choque de temperatura.

A fertilização com sêmen fundido após a irradiação apresentou, no entanto, resultados promissores, com sobrevivência em todos os tratamentos e índice de indivíduos diploides entre as progênes. Os resultados gerados em cada capítulo representam, dessa forma, um importante avanço sobre os mecanismos de manipulação cromossômica e androgênese, inéditos em espécies nativas.

Eles podem subsidiar novos estudos nas áreas de biotecnologia aplicada a reprodução e conservação de espécies. Como foi demonstrado ao longo desta pesquisa, a androgênese apresenta uma diversidade de aplicações em peixes, e esses mecanismos

podem começar a ser explorados para potencializar os estudos e pesquisas na área com espécies nativas.

Para publicação em periódicos de relevância internacional na área, o projeto apresenta algumas direções futuras e refinamentos, como a realização de análises em biologia molecular e testes de paternidade com as progênies (em cada experimento realizado em todas as etapas foram coletadas e congeladas amostras para realização destes ensaios), além da repetição dos protocolos com mais resultados de indivíduos diploides para criação e reprodução de lotes de androgenéticos da espécie.

Desta forma, essas etapas ainda deverão ser desenvolvidas para fornecer ainda mais ferramentas de confirmação para os protocolos aqui delineados e apresentados.

A realização deste trabalho permitiu um desenvolvimento e amadurecimento profissional e acadêmico, possibilitado por uma jornada em que foi possível aprimorar aptidões, definir áreas de interesse de atuação e crescer como pesquisador. Todo o trabalho realizado permitiu a visão do quanto é imprescindível o estudo e atualização constantes, bem como a importância da realização de um bom trabalho de base para estruturar uma pesquisa aplicada.

O desenvolvimento destas tecnologias só foi possível graças a uma série de estudos e pesquisas detalhadas sobre os mecanismos de fertilização, biologia e reprodução das espécies. Com isso, foi possível o delineamento de um pacote tecnológico para manipulação cromossômica e reprodução uniparental, que deverá fornecer subsídios para uma série de pesquisas aplicadas na área.

02031.000007/2016-65
Número Sei0323004

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Rodovia SP-201 (Pref. Euberto Nemésio Pereira de Godoy), Km 6,5 - Bairro , Caixa Postal 64 - CEP
13.630-970 - Pirassununga - SP - www.icmbio.gov.br
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "ANDROGÊNESE EM *Astyanax altiparanae*: FERRAMENTAS DE RECONSTITUIÇÃO EM PEIXES", registrada com o nº 02031.000007/2016-65, sob a responsabilidade de Matheus Pereira dos Santos - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº [11.794](#), de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº [6.899](#), de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/CEPTA) DO (A) Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental, em reunião de 17/08/2016.

Vigência da autorização:		Março de 2014 a Março de 2017	
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica		
No da Solicitação ou Autorização SISBIO:		Nº 48.167	
Atividade(s)	<input type="checkbox"/> Captura <input checked="" type="checkbox"/> Coleta de espécimes <input type="checkbox"/> Marcação <input type="checkbox"/> Outras:		
Espécies/Grupos Taxonômicos:	<i>Astyanax altiparanae</i>		
Local(is) de realização das atividades	CEPTA		

Pirassununga, 18 de agosto de 2016.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Rita de Cascia Barreto Netto, Analista Ambiental**, em 04/01/2017, às 15:37, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.icmbio.gov.br/autenticidade> informando o código verificador **0323004** e o código CRC **349CA154**.

02031.000007/2016-65

0323004v4