

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU (IBB-UNESP)

São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Transplante interespecífico de células germinativas-tronco em
Siluriformes Neotropicais

Lucia Suárez López
Bióloga

**Botucatu
2018**

**TRANSPLANTE INTERESPECÍFICO DE CÉLULAS
GERMINATIVAS-TRONCO EM SILURIFORMES NEOTROPICAIS**

LUCIA SUÁREZ LÓPEZ

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Senhorini

Coorientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Unesp – *Campus* de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Botucatu–SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Suarez López, Lucia.

Transplante interespecífico de células
germinativas-tronco em Siluriformes Neotropicais / Lucia
Suárez López. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: José Augusto Senhorini
Coorientador: George Shigueki Yasui
Capes: 33004064

1. Células-tronco. 2. Células germinativas. 3.
Criopreservação. 4. Transplante de Células-Tronco.

Palavras-chave: Célula germinativas-tronco;
criopreservação; transplante celular.

Aprender a dudar es aprender a pensar.

(Octavio Paz).

Dedico

A mis padres por haberme legado la mayor herencia de todas, mi educación, y enseñarme todo lo necesario para poder enfrentar los retos de la vida, este logro es una muestra más de su esfuerzo y trabajo.

Agradecimentos

Agradezco a toda mi familia, en especial mis padres José del Carmen Suárez Rivera e Josefa López Vidal, a mis hermanas Ana Cristel y Patricia Suárez López porque desde el inicio de mi vida me han apoyado en todos mis sueños.

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu pela oportunidade de ingresso no mestrado. Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, sua coordenação e funcionários pelo apoio, instruções e paciência.

AES Tietê pelo o apoio financeiro para execução deste projeto e a bolsa concedida.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental pela utilização da sua estrutura, desde o alojamento em que me permitiram morar durante todo o tempo de mestrado, pelos materiais e licença para as coletas. Ainda agradeço a os pesquisadores e funcionários pelo apoio e amizade, muito obrigada.

Ao meu orientador, Dr. José Augusto Senhorini, por sua contribuição técnica neste trabalho, além de ser um grande pesquisador e professor. Tenho uma profunda admiração por sua leveza e serenidade como líder e pessoa.

Ao meu coorientador, Dr. George Shigueki Yasui, pelos ensinamentos, auxílio nos experimentos e importantes contribuições ao longo desta pesquisa. Além disso, agradeço pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

Ao Dr. Paulo Sérgio Monzani por sua imensa contribuição intelectual e técnica neste trabalho, além de sua amizade e confiança, não tenho palavras para agradecer.

Ao Dr. Diógenes H. de Siqueira Silva, por sua grande disponibilidade para tirar dúvidas e possibilitar o melhor andamento deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA, Nivaldo Ferreira do Nascimento, Mariana Machado Evangelista, Rafaela Manchin Bertolini, Bruna dos Santos Machado, Dilberto Ribeiro Arashiro, Nycolas Pereira, Matheus Pereira dos Santos, Leonardo Calado, Geovanna Coelho, Hatus Siqueira, Gustavo Shiguemoto, Natália R. de Alcântara Rocha, Talita Lázaro, Lauriene L. de Souza Munhoz, Leonardo Cuel Bortoletto, Natália G. Matheus e Daniela José de Oliveira, por sua amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório.

A família Bertolini, por me fazer sentir parte integrante da família todo este tempo, pela amizade, não tenho palavras para agradecer.

SUMARIO	RESUMO	1
ABSTRACT.....		2
1. INTRODUÇÃO GERAL.....		3
Transplante de células germinativas		4
Criopreservação de células germinativas		5
Espécies modelos.....		6
2. OBJETIVOS.....		8
Geral:		8
Específicos		8
3. Capítulo I: Isolamento e transplante de células germinativas-tronco de		
<i>Pseudopimelodus mangurus</i> em <i>Pimelodus maculatus</i> triploide.....		9
Materiais e métodos		9
Coleta dos animais		9
Produção de peixes triploides		9
Confirmação da ploidia		10
Dissociação enzimática das gônadas		11
Separação e purificação das células germinativas.....		12
Avaliação da viabilidade celular		12
Marcação das células germinativas dos doadores		13
Transplante de células germinativas		13
Avaliação de quimerismo por técnicas histológicas		14
3.1. 10. Avaliação de quimerismo por técnicas moleculares.....		14

3.1.11. Análise de reprodução dos receptores triploides transplantados.	16
3.1.12. Estatística.....	17
Resultados	18
Dissociação enzimática das gônadas e purificação das células germinativas	18
Transplante de células germinativas-tronco e análises de quimerismo .	20
Análise de reprodução dos receptores triploides transplantados.....	23
4. Capítulo II: Isolamento e criopreservação de oogônias-tronco de <i>Pseudopimelodus mangurus</i>	26
Material e métodos.....	26
Animais.....	26
Criopreservação e procedimento de descongelamento.....	27
Estatística.....	28
4.2 Resultados	29
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	36
7. REFERENCIAS.....	38

Lista de Figuras

- Figura 1.** Procedimento de coleta e fertilização *Pseudopimelodus mangurus*. A) Obtenção de oócitos de *P. mangurus*. B) Separação dos oócitos em três alíquotas e fertilização com sêmen de *P. mangurus*, *Pimelodus maculatus* e *P. mangurus* triploides 17
- Figura 2.** Separação celular por gradiente de percoll. Banda 1: Debris celulares; Banda 2: Células germinativas-tronco; Banda 3: Células germinativas-tronco, espermátocitos e espermatozoides; Pellet: Espermatozoides e células sanguíneas. 19
- Figura 3.** Análise microscópica dos constituintes das bandas celulares vindas do gradiente de percoll: a) banda 1; b) banda 2, células germinativas (setas); c) banda 3; d) Pellet. Escalas =20µm..... 20
- Figura 4.** Marcação das células germinativas-tronco com PKH26 e transplante em mandis triploides: a) espermatogônias marcadas com PKH26; b) Mandi triploide recebendo transplante de células. Escala = 50µm..... 21
- Figura 5.** Gônadas dos receptores coletadas aos 30 e 120 dias pós-transplante: **a, b)** as células marcadas com PKH26 são observadas 30 dias pós-transplante na gônada receptora (setas); **c, d)** gônada 120 dias pós-transplante, com presença de oogônias; e com ausência de fluorescência. Escalas = 50µm..... 22
- Figura 6.** PCR usando gradiente de temperatura, para o gene hercc2. O produto de amplificação para *P. mangurus* foi visualizado acima 1Kpb (seta branca) e para *P. maculatus* de 900pb (seta vermelha), sendo a melhor temperatura de anelamento de 58 °C..... 22

Figura 7. Análise dos produtos de amplificação do gene *herc2* do doador, receptor e gônada do receptor. (1) Receptor (*P. maculatus*), (2) doador (*P. mangurus*) e (3) Gônada receptora..... 23

Lista de Tabela

Tabela 1. Estágios de desenvolvimento embrionário de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> e dos híbridos de fêmeas de <i>P. mangurus</i> e machos de <i>Pimelodus maculatus</i> . Os dados foram obtidos de seis repetições e estão expressos como média \pm erro padrão	25
Tabela 2. - Porcentagem de viabilidade de oogônias-tronco pós-descongelamento de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> . Os dados foram obtidos de três repetições e estão expressos como média \pm erro padrão	30

RESUMO

No Brasil os siluriformes neotropicais são o segundo grupo mais ameaçado de extinção com 91 espécies. Neste trabalho, foi empregada a técnica de quimerismo usando duas espécies de siluriformes neotropicais o mandi (*Pimelodus maculatus*) e o bagre sapo (*Pseudopimelodus mangurus*), visando a reconstituição da segunda espécie. Para tal foi estabelecido um protocolo de isolamento, separação, transplante e criopreservação de células germinativas tronco. As gônadas de *P. mangurus* foram digeridas enzimaticamente e as células germinativas tronco foram separadas por gradiente descontinuo de densidade, marcadas com PKH26 e transplantadas via papila urogenital em 32 receptores triploides de *P. maculatus*. Oito gônadas de *P. maculatus* que receberam transplantes foram analisadas por cortes histológicos e microscopia de epifluorescência para identificação das células germinativo tronco transplantadas, sendo encontradas células do doador em duas gônadas receptoras. Parte das gônadas, bem como do tecido muscular de *P. maculatus* e de *P. mangurus* foram utilizados para a extração do DNA genômico e serão utilizados para análise molecular, por a construção de primers, para confirmação do quimerismo. O protocolo estabelecido de criopreservação de células germinativas-tronco de *P. mangurus* permitirá transplante via intraperitoneal em larvas triploides, durante o período reprodutivo. Este trabalho é pioneiro no transplante de células germinativas-tronco em espécies de siluriformes neotropicais, usando receptores adultos triploides. Os resultados obtidos neste deste estudo poderá ser futuramente empregado em outras espécies nativas que están em perigo de extinção ou de importância na

aquicultura. **Palavras chave:** Célula germinativas-tronco, transplante celular, criopreservação.

ABSTRACT

In Brazil, Neotropical siluriformes are the second more endangered group with 91 species. In this work, the technique of chimerism was used with two species of Neotropical siluriformes, mandiçari (*Pimelodus maculatus*) and bagre sapo (*Pseudopimelodus mangurus*), aiming the reconstitution of the second species. Therefore, was established a protocol for isolation; separation and transplantation of stem germ-cells. The gonads of *P. mangurus* were enzymatic digested and the stem germ-cells separated using a discontinuous density gradient, labeled with PKH26 and transplanted through the urogenital papillae in 32 triploids recipients of *P. maculatus*. The gonads of eight fish that have received the stem germ-cells were analyzed by histology and fluorescent microscopy for identification of the germ-cell transplanted, and cells from the donor fish were identified in the recipient gonads. For confirmation of chimerism, part of the gonads, as well the muscle tissue of *P. maculatus* and *P. mangurus* was used for extraction of genomic DNA, for primers construction and confirmation of the chimerism. The developed protocol for cryopreservation of stem germ-cells of *P. mangurus* will allow the transplant via urogenital papilla in triploid larvae during the spawning season. This work is pioneer in the transplant of stem germ-cells in Neotropical siluriformes using adult triploids as recipients. The results of this study may be applied in future endangered native species or with importance to aquaculture.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Na região neotropical foram identificadas 4.475 espécies de peixes em águas continentais (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003), sendo que cerca de 77% das espécies foram classificadas na classe Ostariophysi, a qual inclui as ordens Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes (ALBERT; PETRY e REIS, 2011). O Brasil, o qual está localizado na região neotropical, foram identificadas 2.587 espécies de peixes de águas doces, totalizando cerca 10% das espécies de peixes identificados no mundo (BUCKUP; MENEZES e GHAZZI, 2007). A ordem Siluriforme é a mais abundante com 1.915 espécies conhecidas, compreendidas em 15 famílias (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003; REIS et al., 2016).

Os impactos causados nas bacias hidrográficas, como a pesca predatória, introdução de espécies exóticas, contaminação aquática, destruição das matas ciliares e a construção de barragens para produção de energia pelas usinas hidrelétricas, refletem na acentuada redução das populações da ictiofauna brasileira (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003; AGOSTINHO; THOMAZ e GOMES, 2005; BELLARD; CASSEY e BLACKBURN, 2016). Estima-se que 312 espécies de peixes continentais se encontram em perigo de extinção, como pode ser verificado no Livro Vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção, onde os Siluriformes são o segundo grupo mais afetado com 91 espécies ameaçadas (ICMBIO, 2016).

Por tanto, em vista das problemáticas acima citadas, a aplicação de biotecnologias reprodutivas, tais como manipulação cromossômica, criopreservação de gametas em nitrogênio líquido, androgênese, ginogênese e quimerismo, podem ser usadas para auxiliar na conservação e reconstituição de espécies ameaçadas de extinção, bem como na produção de peixes de alto valor comercial na aquicultura (YAMAHA et al., 2007; LUJIC et al., 2015).

Transplante de células germinativas

As células germinativas primordiais (PGCs) são células precursoras das células germinativas-tronco (espermatogônias ou oogônias), e estas últimas têm a capacidade de se reproduzirem indefinidamente, possuem alta plasticidade sexual podendo diferenciar-se em gametas de ambos sexos (OKUTSU et al., 2006; CINALLI; RANGAN e LEHMANN, 2008; NÓBREGA et al., 2010). As células germinativas-tronco transmitem informação genética para a geração seguinte, tanto pela herança citoplasmática como pela nuclear, e são importantes para manter a variabilidade genética de uma população (YASUI; FUJIMOTO e ARAI, 2010; LEE et al., 2013). Portanto, as PGCs e as células germinativas-tronco são alvos atrativos para a aplicação de biotécnicas reprodutivas, como o quimerismo, bem como para formação de banco genético através da criopreservação a longo prazo em nitrogênio líquido.

O quimerismo consiste em remover as células germinativa (PGCs, espermatogônias ou oogônias) do doador para ser transplantadas em receptor estéril, onde as células proliferaram e se desenvolverem em gametas com características genéticas do doador (OKUTSU et al., 2007; NÓBREGA et al., 2010; YOSHIZAKI, GORO et al., 2010; YOSHIZAKI, G et al., 2010).

Diferentes metodologias foram desenvolvidas para a geração de quimera germinativa em peixes. As PGCs têm sido utilizadas no transplante para embriões receptores no estágio de blástula, sendo coletadas de embriões doadores e transplantada em embriões receptores mediante o uso de micromanipulação (CIRUNA et al., 2002; YOSHIZAKI et al., 2002; SAITO et al., 2008; LI et al., 2016). Além disso, as PGCs e as células germinativas-tronco também podem ser transplantadas na cavidade peritoneal, perto da crista genital, de larvas triploides recém eclodidas (OKUTSU et al., 2007; YOSHIKAWA et al., 2017).

O método mais utilizado em adultos é o transplante de células germinativas-tronco em peixes estéreis, via papila urogenital. Para isso, os receptores são previamente tratados com busulfan, que é um agente quimioterápico e atua na supressão endógena das células germinativas. No entanto, a esterilização por este método químico não é permanente, uma vez que após alguns meses as células endógenas do receptor começam a se proliferar novamente (LACERDA et al., 2008; NÓBREGA et al., 2010; MAJHI et al., 2014; DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015). Alternativamente, técnicas de manipulação cromossômica, como a triploidização, podem ser usadas para esterilização do receptor, já que organismos triploides são geralmente estéreis ou inférteis (TAKEUCHI et al., 2016), sendo considerados receptores ideais de células exógenas, visando a geração de quimeras germinativas.

Criopreservação de células germinativas

A criopreservação de gametas de peixes é considerada uma estratégia de geração de banco genético, para estocagem a longo prazo e posterior reprodução artificial (LABBÉ; ROBLES e HERRAEZ, 2013). A criopreservação

de sêmen é uma técnica que tem sido eficientemente aplicada, podendo estes gametas serem utilizados para a manutenção de variabilidade genética em reprodução artificial ou reconstituição de espécies por androgênese. No entanto, o sêmen não preserva o material genético materno, como o plasma germinativo e DNA mitocondrial (YASUI; FUJIMOTO e ARAI, 2010), que são importantes para manter a variabilidade genética de uma população, bem como a manutenção das características genéticas da espécie. A criopreservação de oócitos e embriões de peixes ainda não foi obtida devido as características fisiológicas, como grande tamanho e grande quantidade de vitelo que dificulta a ação das moléculas crioprotetoras (LABBÉ; ROBLES e HERRAEZ, 2013). Em vista das desvantagens da criopreservação de espermatozoides e as dificuldades mencionadas anteriormente para criopreservar oócitos e embriões, as PGCs e as células germinativas-tronco são uma alternativa para a criopreservação e sua estocagem a longo prazo, devido ao tamanho reduzido e ausência de vitelo (RIESCO et al., 2012).

Espécies modelos

O grande número de espécies ameaçadas de Siluriformes no Brasil e a escassez de trabalhos envolvendo a técnica de quimerismo visando a conservação das espécies desta ordem, foram aspectos motivadores para a realização do presente trabalho. Duas espécies de Siluriformes neotropicais foram usadas como modelo experimental, visando o emprego da técnica de quimerismo para geração de banco genético e conservação de espécies ameaçadas. A espécie doadora escolhida foi o *Pseudopimelodus mangurus*, conhecido comumente como bagre sapo, e que ocorre nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai; e que foi categorizada como espécie vulnerável

no Livro Vermelho de Fauna Ameaçada na bacia do rio Paraná, principalmente no Estado de São Paulo (ABILHOA; DUBOC e MIKICH, 2004; PAULO, 2014).

A espécie selecionada como receptora foi o *Pimelodus maculatus*, popularmente conhecido como mandi amarelo, a qual é encontrada na bacia dos rios Paraná, Prata, Uruguai e Iguazu, e apresenta boa aceitação na pesca comercial (GODOY, 1987; LOLIS e ANDRIAN, 1996; ALBERT; PETRY e REIS, 2011). As principais características para a escolha do mandi como espécie receptora foram as facilidades de reprodução, manejo e cultivo em cativeiro. Características que permitem a aplicação de metodologias laboratoriais como a produção de peixes triploides estéreis, por meio de choque de temperatura, tornando esta espécie ideal para ser receptores de células germinativas e desenvolver unicamente gametas da espécie doadora.

2. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O isolamento e transplante de células germinativas-tronco foi realizado pela primeira vez em duas espécies de siluriformes neotropicais, usando como receptores peixes adultos triploides. Os primers utilizados para avaliação de quimerismo precisam ser melhorados, por tanto os produtos de PCR de *P. maculatus* e *P. mangurus* serão sequenciados novamente para refazer primers mais específicos, e posteriormente serão avaliadas todas as gônadas usadas nos estudos histológicos e de fertilização. Além disso, serão feitas a construção e sequenciamento de biblioteca de microssatélite de *P. mangurus*, na busca de microssatélites específicos desta espécie para posteriores estudos de quimerismo e populacionais.

A criopreservação de oogônias-tronco de *P. mangurus* foi estabelecida com sucesso, sendo o propaneíol 1.5 M o melhor crioprotector para sua estocagem a longo prazo em nitrogênio líquido. Este foi um passo importante para a constituição de bancos genéticos de oogônias de *P. mangurus* visando o transplante via intraperitoneal em larvas triploides de *P. maculatus*. Esta estratégia é importante para a conservação e restauração de espécies ameaçadas de extinção ou de importância na aquicultura, utilizando receptores com reprodução mais rápidas e com sucessivos eventos reprodutivos.

A rejeição nos transplantes tem sido discutida por vários pesquisadores e, portanto, a produção de receptores que apresentem menor rejeição é fundamental para o sucesso da aplicação das técnicas de quimerismo germinativo. O uso de híbridos triploides de *P. mangurus* e *P. maculatus* pode ser uma estratégia que minimize a rejeição do transplante tanto em adultos com em larvas.

A proliferação de células germinativas-tronco em gônadas de receptores adultos depende da formação de nichos livres de células germinativas endógenas. Por tanto o uso de busulfan em triploides adultos receptores, anterior ao transplante, pode ser uma estratégia que aumente a eficácia desta técnica de quimerismo germinativo.

Pouco se sabe sobre a rejeição de células transplantadas em peixes, por tanto, o estudo da ação imunológica básica é fundamental, para a ação do uso de imunossuppressores em o transplante de células germinativas em peixes. A avaliação do uso de imunossupressor anterior à transplante pode ser uma estratégia que pode melhorar a eficácia da técnica de quimerismo.

Com tudo, os resultados obtidos em esta pesquisa serviram como base para realizar outros estudos que permitam gerar com sucesso uma quimera germinativa.

3. REFERENCIAS

- ABILHOA, V.; DUBOC, L. e MIKICH, S. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. **Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná (IAP). 630p.[Links]**, 2004.
- AGOSTINHO, Â. A.; THOMAZ, S. M. e GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 70-78, 2005.
- ALBERT, J. S.; PETRY, P. e REIS, R. E. Major biogeographic and phylogenetic patterns. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, p. 21-57, 2011.
- BELLARD, C.; CASSEY, P. e BLACKBURN, T. M. Alien species as a driver of recent extinctions. **Biology Letters**, v. 12, n. 2, p. 20150623, 2016. ISSN 1744-9561.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.; RISTERUCCI, A.-M.; BAURENS, F.-C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, n. 4, p. 277-288, 1999. ISSN 0248-1294.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. e GHAZZI, M. S. A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional Rio de Janeiro, 2007.
- CINALLI, R. M.; RANGAN, P. e LEHMANN, R. Germ cells are forever. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 559-562, 2008. ISSN 0092-8674.
- CIRUNA, B.; WEIDINGER, G.; KNAUT, H.; THISSE, B.; THISSE, C.; RAZ, E.; SCHIER, A. F. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 14919-14924, 2002. ISSN 0027-8424.
- DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; DOS SANTOS SILVA, A. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033-1042, 2015. ISSN 0093-691X.
- DOBRINSKI, I. Transplantation of germ cells and testis tissue to study mammalian spermatogenesis. **Anim Reprod**, v. 3, n. 2, p. 135-145, 2006.
- HIGUCHI, K.; TAKEUCHI, Y.; MIWA, M.; YAMAMOTO, Y.; TSUNEMOTO, K.; YOSHIZAKI, G. Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. **Fisheries science**, v. 77, n. 1, p. 69-77, 2011. ISSN 0919-9268.
- GODOY, M. P. Peixes do Estado de Santa Catarina. **Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis.**, v. 57, 1987.
- ICMBIO. ICMBio □ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2016. Sumário executivo do Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de

extinção. . **Sumário executivo do Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_da_fauna_brasileira_ameacada_de_extincao_2016.pdf 2016.

LABBÉ, C.; ROBLES, V. e HERRAEZ, M. **Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation:** Woodhead Publishing Ltd 2013.

LACERDA, S.; APONTE, P.; COSTA, G.; CAMPOS-JUNIOR, P.; SEGATELLI, T.; SILVA, M.; FRANÇA, L. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. **Anim Reprod**, v. 9, n. 4, p. 798-808, 2012.

LACERDA, S.; BATLOUNI, S.; SILVA, S.; HOMEM, C.; FRANÇA, L. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Anim Reprod**, v. 3, n. 2, p. 146-159, 2006.

LACERDA, S.; BATLOUNI, S. R.; ASSIS, L. H.; RESENDE, F. M.; CAMPOS-SILVA, S. M.; CAMPOS-SILVA, R.; SEGATELLI, T. M.; FRANCA, L. R. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Cybiurn**, v. 32, n. 2, p. 115-118, 2008.

LEE, S.; SEKI, S.; KATAYAMA, N.; YOSHIZAKI, G. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

LEE, S.; IWASAKI, Y.; SHIKINA, S.; YOSHIZAKI, G. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 5, p. 1640-1645, 2013. ISSN 0027-8424.

LEE, S.; IWASAKI, Y. e YOSHIZAKI, G. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. **Cryobiology**, v. 73, n. 2, p. 286-290, 2016. ISSN 0011-2240.

LEE, S. e YOSHIZAKI, G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 165-168, 2016. ISSN 0011-2240.

LINHARTOVÁ, Z.; RODINA, M.; GURALP, H.; GAZO, I.; SAITO, T.;
 □3□â□(□1□,□ý□.□\$□,□ □0□.□ □,□V□R□O□D□W□L□R□Q□ □D□Q□G□ □
 tench (*Tinca tinca*). **Czech J. Anim. Sci**, v. 59, p. 381-390, 2014.

LI, M.; HONG, N.; XU, H.; SONG, J.; HONG, Y. Germline replacement by blastula cell transplantation in the fish medaka. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

LOLIS, A. e ANDRIAN, I. D. F. Alimentação de *Pimelodus maculatus* Lacépède 1803 (Siluriformes, Pimelodidae), na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 1996.

LUJIC, J.; BERNATH, G.; MARINOVIC, Z.; LEFLER, K.; URBANYI, B.; HORVATH, A. Spermatogonial Transplantation As A Novel Technique In Aquaculture And Fish Conservation. 2015.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. M.; STRÜSSMANN, C. A. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95294, 2014. ISSN 1932-6203.

MORITA, T.; KUMAKURA, N.; MORISHIMA, K.; MITSUBOSHI, T.; ISHIDA, M.; HARA, T.; KUDO, S.; MIWA, M.; IHARA, S.; HIGUCHI, K. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Biology of reproduction**, v. 86, n. 6, p. 176-176, 2012. ISSN 0006-3363.

MORITA, T.; MORISHIMA, K.; MIWA, M.; KUMAKURA, N.; KUDO, S.; ICHIDA, K.; MITSUBOSHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Functional Sperm of the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were produced in the small-bodied surrogate, Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*). **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 644-654, 2015. ISSN 1436-2228.

NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; DE FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12808, 2010. ISSN 1932-6203.

OKUTSU, T.; AYAKA, Y.; NAGASAWA, K.; SHIKINA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 6, p. 685-693, 2006. ISSN 0916-8818.

OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517-1517, 2007. ISSN 0036-8075.

OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2725-2729, 2006. ISSN 0027-8424.

PAIVA, A. L. B. e KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 5, p. 1078-1080, 2008. ISSN 1755-0998.

PAULO, S. **DECRETO Nº 60.133, DE 7 DE FEVEREIRO DE 2014**. 2014
REIS, R.; ALBERT, J.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M.; PETRY, P.; ROCHA, L. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016. ISSN 1095-8649.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. e FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003. ISBN 8574303615.

RIESCO, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; CHEREGUINI, O.; ROBLES, V. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 122-130. e2, 2012. ISSN 0093-691X.

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 1, p. 159-166, 2008. ISSN 0006-3363.

TAKEUCHI, Y.; YATABE, T.; YOSHIKAWA, H.; INO, Y.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock. **Aquaculture**, 2016. ISSN 0044-8486.

XAVIER, P. L.; SENHORINI, J. A.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A.; DOS SANTOS, S. A.; YASUI, G. S. A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in genetics**, v. 8, p. 131, 2017. ISSN 1664-8021.

YAMAHA, E.; SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. **Journal of Sea Research**, v. 58, n. 1, p. 8-22, 2007. ISSN 1385-1101.

YASUI, G. S.; FUJIMOTO, T. e ARAI, K. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. **Aquaculture**, v. 308, p. S140-S144, 2010. ISSN 0044-8486.

YOSHIKAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; INO, Y.; WANG, J.; IWATA, G.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). **Aquaculture**, v. 478, p. 35-47, 2017. ISSN 0044-8486.

YOSHIZAKI, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. **Development**, v. 137, n. 8, p. 1227-1230, 2010. ISSN 0950-1991.

YOSHIZAKI, G.; OKUTSU, T.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; TAKEUCHI, Y. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. **Anim Reprod**, v. 7, n. 3, p. 187-96, 2010.

YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, Y.; KOBAYASHI, T.; IHARA, S.; TAKEUCHI, T. Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 3-12, 2002. ISSN 0920-1742.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; DOS SANTOS SILVA, A. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033-1042, 2015. ISSN 0093-691X.

DOBRINSKI, I. Transplantation of germ cells and testis tissue to study mammalian spermatogenesis. **Anim Reprod**, v. 3, n. 2, p. 135-145, 2006.

HIGUCHI, K.; TAKEUCHI, Y.; MIWA, M.; YAMAMOTO, Y.; TSUNEMOTO, K.; YOSHIZAKI, G. Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. **Fisheries science**, v. 77, n. 1, p. 69-77, 2011. ISSN 0919-9268.

LACERDA, S.; APONTE, P.; COSTA, G.; CAMPOS-JUNIOR, P.; SEGATELLI, T.; SILVA, M.; FRANÇA, L. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. **Anim Reprod**, v. 9, n. 4, p. 798-808, 2012.

LACERDA, S.; BATLOUNI, S. R.; ASSIS, L. H.; RESENDE, F. M.; CAMPOS-SILVA, S. M.; CAMPOS-SILVA, R.; SEGATELLI, T. M.; FRANCA, L. R. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Cybiurn**, v. 32, n. 2, p. 115-118, 2008.

LEE, S.; IWASAKI, Y. e YOSHIZAKI, G. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. **Cryobiology**, v. 73, n. 2, p. 286-290, 2016. ISSN 0011-2240.

LEE, S.; SEKI, S.; KATAYAMA, N.; YOSHIZAKI, G. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

LEE, S. e YOSHIZAKI, G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 165-168, 2016. ISSN 0011-2240.

LINHARTOVÁ, Z.; RODINA, M.; GURALP, H.; GAZO, I.; SAITO, T.;
□3□â□(□1□,□ý□.□\$□,□ □0□.□ □,□V□R□O□D□W□L□R□Q□ □D□Q□G□ □
tench (*Tinca tinca*). **Czech J. Anim. Sci**, v. 59, p. 381-390, 2014.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. M.; STRÜSSMANN, C. A. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of

germ cells in cytoablated adult fish. **PLoS one**, v. 9, n. 4, p. e95294, 2014. ISSN 1932-6203.

MORITA, T.; KUMAKURA, N.; MORISHIMA, K.; MITSUBOSHI, T.; ISHIDA, M.; HARA, T.; KUDO, S.; MIWA, M.; IHARA, S.; HIGUCHI, K. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Biology of reproduction**, v. 86, n. 6, p. 176-176, 2012. ISSN 0006-3363.

MORITA, T.; MORISHIMA, K.; MIWA, M.; KUMAKURA, N.; KUDO, S.; ICHIDA, K.; MITSUBOSHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Functional Sperm of the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were produced in the small-bodied surrogate, Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*). **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 644-654, 2015. ISSN 1436-2228.

NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; DE FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12808, 2010. ISSN 1932-6203.

OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517-1517, 2007. ISSN 0036-8075.

OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2725-2729, 2006. ISSN 0027-8424.

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 1, p. 159-166, 2008. ISSN 0006-3363.

YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y.; HIGUCHI, K.; YATABE, T.; KABEYA, N.; YOSHIZAKI, G. Chub Mackerel Gonads Support Colonization, Survival, and Proliferation of Intraperitoneally Transplanted Xenogenic Germ Cells 1. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 5, p. 896-904, 2010. ISSN 0006-3363.

YOSHIKAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; INO, Y.; WANG, J.; IWATA, G.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). **Aquaculture**, v. 478, p. 35-47, 2017. ISSN 0044-8486.

YOSHIZAKI, G.; FUJINUMA, K.; IWASAKI, Y.; OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y. Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 55-61, 2011. ISSN 1744-117X.

YOSHIZAKI, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. **Development**, v. 137, n. 8, p. 1227-1230, 2010. ISSN 0950-1991.