

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari
Astyanax Altiparanae, um peixe teleósteo

Marcos Natom Pereira Dias

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Botucatu – SP

2025

Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari
Astyanax Altiparanae, um peixe teleósteo

Marcos Natom Pereira Dias

Orientador:

Dr. George Shigueki Yasui

Coorientadores:

Dra. Lucia Suárez López

Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento

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.

D541f

Dias, Marcos Natom Pereira

Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari
Astyanax Altiparanae, um peixe teleósteo / Marcos Natom Pereira
Dias. -- Botucatu, 2025

40 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: George Shigueki Yasuí

Coorientadora: Lucia Suárez López

1. *Astyanax altiparanae*. 2. Androgênese. 3. Manipulação
cromossômica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari *Astyanax Altiparanae*, um peixe teleósteo

AUTOR: MARCOS NATOM PEREIRA DIAS

ORIENTADOR: GEORGE SHIGUEKI YASUI

COORIENTADOR: NIVALDO FERREIRA DO NASCIMENTO

COORIENTADORA: LUCIA SUÁREZ LÓPEZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI (Participação Presencial)
Ciências Biológicas / Universidade estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru

Prof. Dr. ANDRÉ FURUGEN CÉSAR DE ANDRADE (Participação Presencial)
Departamento de Reprodução Animal / Universidade de São Paulo - USP

Botucatu, 05 de agosto de 2025



Documento assinado digitalmente
FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Data: 11/08/2025 15:59:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

"Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida"

– SÓCRATES.

***"Estudar os peixes é mergulhar em um universo silencioso,
onde cada espécie guarda, nas profundezas, os segredos da vida
e da evolução."***

– Autoria Própria

***A Gracivany Pereira de Araujo, por todo apoio
por toda luta que enfrentamos para podermos
chegar aqui, se não fosse pela senhora nada
disso estaria acontecendo.***

DEDICO!

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente a Deus, pela vida, pela coragem, pela determinação, pelos livramentos, pôr o meu maior expirador e que fez com que tudo desse certo na minha vida.

Quero agradecer a minha família, em especial a minha mãe Gracivany pereira de Araujo, que sempre me ajudou e sempre me motivou, que sempre fez de tudo por mim e meus irmãos. Agradecer ao meu tio Fabiano Pereira De Araujo que foi um pai pra mim, que me ensinou muitas coisas valiosas que levarei por resto da vida, que sempre me ajudou como pode.

Quero agradecer aos meus irmãos, Emanuel Dias Pereira Neto e Jhennyfer emmanuele Isabela Pereira Dias, que sempre me ajudaram e me incentivaram a continuar mesmo pensando em desistir na maioria das vezes.

Quero agradecer a minha namorada, Thais Oliveira Lopes da Silva, pelo companheirismo, por sempre me incentivar a não desistir, pelo carinho, amor e admiração que tens por me, obrigado por tudo que fez e faz pela gente.

Ao Dr. José Augusto Senhorini (im-memoriám), que mesmo com dificuldades, sempre me ajudou de alguma forma, agradecer também pelos ensinamentos que foi passado para mim, e pela amizade e companheirismo ao longa de sua carreira.

Quero agradecer ao coordenador do Laboratório de Biotecnologia de Peixes, Dr. George Shigueki Yasui, que me ajudou no meu trabalho, me deu uma força para que eu conseguisse concluir meu mestrado, me deu conselhos que irei levar para o resto da vida. Me ensinou técnicas inovadoras que usarei na minha carreira profissional, mostrou que com peixe quase tudo é possível, obrigado professor.

Quero agradecer ao meu Coorientador, Nivaldo Ferreira Do Nascimento, que me incentivou a não parar, me ajudou a vim pra São Paulo para poder fazer Pós-graduação, que me ajudou na minha dissertação, e que se tornou um grande amigo.

Quero agradecer a minha coorientadora, Lucia Suarez Lopez, que sempre me apoiou com meus trabalhos em laboratórios e sempre me deu bronca quando ensinava uma coisa e eu ainda fazia errado, agradecer pela paciência que teve comigo e pelo aprendizado passado a me, muito obrigado.

Quero agradecer ao Laboratório de Biotecnologia de Peixes, por ter me acolhido e me dado oportunidade para desenvolver meu trabalho de pesquisa, por todo material cedido pra mim e por todo apoio.

Quero agradecer também aos integrantes do laboratório, Alice Xavier Soares, Brenda Dumbra Lançone, Gabriella Braga Carvalo, Leydiane da Paixão Serra, Tamiris Imaeda Yassumoto, por sempre me ajudar quando precisei, por ter me dado apoio dentro do laboratório, pela amizade e companheirismo.

Quero agradecer a Augusto herrique, Lais Pereira, Nathalia Gleice e Roberto Ruy, pela amizade e companheirismo dentro do laboratório.

Quero agradecer a Pós-graduação por sempre ter respondido rápido e sempre ter tirado as dúvidas que tinha.

Quero agradecer a Capes pela bolsa concedida, pois foi de grande ajuda para minha carreira acadêmica, sem a bolsa não teria conseguido chegar até aqui, muito obrigado.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Fabio Porto-foresti e ao seu laboratório de Genômica e conservação de peixes, pela parceria e ajuda com as análises de dados para conclusão do meu trabalho.

Agradeço a todos que fazem parte dessa conquista na minha vida, a caminhada até aqui nunca foi fácil, mais Deus está comigo e eu não irei desistir.

OBRIGADO A TODOS!!!

RESUMO

Considerando os desafios associados ao uso de radiação na produção de peixes androgenéticos, nesse estudo mostra que é possível induzir com sucesso a androgênese em *Astyanax altiparanae* utilizando apenas o choque térmico durante a ativação dos gametas. Primeiramente, foi verificada a motilidade espermática a 4°C, 26°C e 40°C. Posteriormente, foi validado o potencial de fertilização desses espermatozoides. Constatada a motilidade espermática, passou-se então para testes de fertilização, foram então utilizados cinco casais diploides (2n), previamente submetidos à indução hormonal para obtenção de desovas por extrusão. Após a coleta dos gametas, os ovócitos foram divididos em três grupos: controle (sem choque térmico), fertilização com água fria (4°C) e fertilização com água quente (40°C). O desenvolvimento embrionário foi monitorado para avaliação da fertilização e eclosão. Foram também coletadas 25 larvas de cada tratamento para análise por citometria de fluxo e genotipagem, com o objetivo confirmar a herança uniparental. Embora motilidade espermática não tenha diferido entre os grupos, o tempo de motilidade foi significativamente maior a 4°C, indicando que temperaturas mais baixas prolongam a duração da motilidade espermática. A citometria revelou que a fertilização fria gerou 14 larvas haploides, 9 diploides e 2 triploides, enquanto a fertilização quente resultou em 14 haploides, 2 diploides e 15 triploides (dentre 50 larvas analisadas). Os resultados demonstram o potencial da fertilização com choque térmico como estratégia viável para indução de androgênese em *A. altiparanae*, contribuindo para o desenvolvimento de biotecnologias aplicáveis à conservação genética e à produção de linhagens monosexo na aquicultura.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*, androgênese, manipulação cromossômica.

ABSTRACT

Considering the challenges associated with the use of radiation in the production of androgenetic fish, this study shows that it is possible to successfully induce androgenesis in *Astyanax altiparanae* using only temperature shock during gamete activation. Firstly, sperm motility was verified at 4°C, 26°C and 40°C, to verify the fertilization potential of these spermatozoa. Once sperm motility was verified, fertilization tests were then carried out, and five diploid couples (2n) were used, previously submitted to hormonal induction to obtain spawning by stripping. After the collection of the gametes, the oocytes were divided into three groups: control (without temperature shock), fertilization with cold water (4°C) and fertilization with warm water (40°C). Embryonic development was monitored to evaluate fertilization and hatching. 25 larvae of each treatment were also used for analysis by flow cytometry and genotyping, in order to confirm uniparental inheritance. Although sperm motility did not differ between the groups, the motility duration was significantly longer at 4°C, indicating that lower temperatures prolong the duration of sperm motility. Flow cytometric analysis revealed that cold fertilization generated 14 haploid, 9 diploid and 2 triploid larvae, while warm fertilization resulted in 14 haploid, 2 diploid and 15 triploid larvae (out of 50 larvae analyzed). The results demonstrate the potential of heat shock fertilization as a viable strategy for androgenesis induction in *A. altiparanae*, contributing to the development of biotechnologies applicable to genetic conservation and the production of monosex lines in aquaculture.

Keywords: *Astyanax altiparanae*, androgenesis, chromosomal manipulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de lambari-do-rabo-amarelo (<i>Astyanax altiparanae</i>).....	15
Figura 2 - Representação esquemática do sistema utilizado para avaliação da motilidade espermática em diferentes temperaturas. A – Circulação de água fria (4°C) a partir de um aquário resfriado, passando pela lâmina e retornando ao aquário. B – Circulação de água quente (40°C) a partir de um banho-maria, passando pela lâmina e retornando ao banho-maria.	18
Figura 3 - Procedimentos adotados para a obtenção dos gametas e realização dos protocolos de fertilização. A fertilização controle foi realizada a 26°C, a fertilização fria a 4°C, e a fertilização quente a 40°C.	21
Figura 4 - Trajetória dos espermatozoides de <i>Astyanax lacustris</i> durante 1 segundo de motilidade, após ativação com água a 26 °C (A), 4 °C (B) e 40 °C (C).	23
Figura 5 - Motilidade espermática e parâmetros cinemáticos de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes temperaturas (Controle, Quente e Frio) ao longo do tempo após a ativação. (A) Motilidade (%); (B) Velocidade curvilínea (VCL, µm/s); (C) Velocidade média de deslocamento (VMD, µm/s); (D) Velocidade em linha reta (VLR, µm/s). Os dados representam média ± erro padrão (n = 3). As letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em cada tempo (ANOVA; P < 0,05). A partir de 60 segundos, apenas o tratamento Frio apresentou motilidade, sendo os dados apresentados de forma descritiva.	25
Figura 6 - Histogramas de citometria de fluxo representando o conteúdo relativo de DNA após fertilização a quente (40°C); A –sêmen haploide; B –larvas haploides; C – larvas diploides; D – larva triploide.....	29
Figura 7 - Histogramas de citometria de fluxo representando o conteúdo relativo de DNA após fertilização a frio (4°C). A – sêmen haploide; B – larvas haploides; C – larvas diploides; D – larvas triploides.	29
Figura 8 - Exemplos de larvas com diferentes graus de deformidade morfológica. A e B – Larvas com morfologia normal. C, D, E e F – Larvas com deformidades leves. G, H, I, J e K – Larvas com deformidades severas.	30
Figura 9 - Cromossomos metafásicos das larvas de <i>Astyanax altiparanae</i> , A – haploide; B – diploide; C – triploide.....	31

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Desenvolvimento embrionário do lambari do rabo amarelo (<i>Axtyanax altiparanae</i>) após fertilização do controle (26°C), fria (4,0°C) e quente (40°C).	27
Tabela 2 - Resultado da citometria de fluxo do controle, da fertilização fria e fertilização quente.	28

SUMÁRIO

1.	Introdução	11
1.1	Manipulação cromossômica.....	12
1.2	Lambari (<i>Astyanax altiparanae</i>) como espécie modelo.....	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Local e Aspectos Éticos	16
3.2	Motilidade espermática em água quente e fria	17
3.3	Origem dos parentais e Indução hormonal	19
3.4	Fertilização fria e quente.....	20
3.5	Confirmação da ploidia por citometria de fluxo	21
3.6	Confirmação por citogenética	22
3.7	Análise estatística	22
4	RESULTADOS.....	23
4.1	Motilidade espermática em água quente e fria	23
4.2	Desenvolvimento embrionário e sobrevivência.....	26
4.3	Confirmação da ploidia por citometria de fluxo	28
4.4	Citogenética	31
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO.....	35
7	REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A região Neotropical concentra a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, com mais de 6.000 espécies registradas (Albert et al., 2020). Dentre esses, o Brasil concentra mais da metade dessa diversidade, com mais de 3.000 espécies (ICMBio, 2018). Essa expressiva biodiversidade faz dos peixes continentais um recurso de grande importância nutricional, econômica e social, especialmente para comunidades ribeirinhas.

A aquicultura brasileira tem apresentado crescimento constante nos últimos anos. Segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR, 2024), em 2023 foram produzidas 887.029 toneladas de pescado, movimentando aproximadamente R\$ 9 bilhões e gerando mais de 3 milhões de empregos diretos e indiretos em todo o país. Entre as espécies com relevância crescente na aquicultura nacional, destaca-se o lambari-de-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Algumas espécies ganham destaque na aquicultura por apresentarem rápido crescimento e bom desempenho zootécnico (Winemiller et al., 2007). Este peixe é amplamente utilizado tanto para consumo humano quanto como isca na pesca esportiva (Nascimento, 2015). Recentemente, a espécie tem sido utilizada também como modelo experimental em estudos laboratoriais no Brasil (Yasui et al., 2022), devido à sua ampla adaptabilidade a diversos ambientes e manejo, que vai desde ambientes naturais como açudes e rios até sistemas de cultivo em cativeiro.

Em condições laboratoriais ou sistemas de cultivo intensivo, o lambari pode se reproduzir durante todo o ano (Evangelista et al., 2019), o que o torna ideal para experimentação. Devido ao seu tamanho reduzido, facilidade de manejo e reprodução fácil, *A. altiparanae* tem se destacado como espécie modelo em pesquisas sobre manipulação reprodutiva e melhoramento genético. Técnicas testadas nesse modelo podem, posteriormente, ser aplicadas com eficiência em espécies de maior porte e maior valor comercial (Yasui et al., 2015).

Nesse contexto, a Biotecnologia surge como uma importante aliada no desenvolvimento de ferramentas inovadoras para a produção e conservação de genótipos ameaçados de peixes. Dentre essas ferramentas, destaca-se a manipulação cromossômica, com grande potencial de impacto na aquicultura (Arai, 2001). Instituições de pesquisa têm desempenhado papel crucial no aprimoramento dessas tecnologias, contribuindo para o avanço da aquicultura nacional. A aplicação da biotecnologia permite a geração de animais com melhor desempenho zootécnico,

maior resistência a doenças, crescimento acelerado e melhor qualidade de carne, o que contribui para atender à crescente demanda global por alimentos de origem aquática (de Siqueira-Silva et al., 2018; Nascimento, 2015).

Dentre essas técnicas com potencial de alavancar a produção aquícola, se destaca a manipulação cromossômica, que são biotécnicas que alteram cromossomos dos peixes. As principais técnicas de manipulação cromossômica utilizadas na aquicultura, destacam-se a poliploidia, a ginogênese e a androgênese (Basavaraju, 2022; Goswami et al., 2022; Komen & Thorgaard, 2007). A produção de indivíduos triploides (3n), por exemplo, tem ganhado destaque em diversas espécies de peixes de interesse comercial, pois combina vantagens como a esterilidade, que impede a reprodução não controlada, e um potencial aumento no crescimento somático (Arai & Fujimoto, 2018; do Nascimento et al., 2017). A utilização de peixes estéreis também é uma estratégia eficaz para mitigar riscos ambientais, como o escape de animais provindos de cultivo e sua subsequente reprodução em ambientes naturais (Piferrer et al., 2009).

1.1 MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA

A manipulação cromossômica é um conjunto de técnicas utilizadas para alterar a quantidade e a organização dos cromossomos em diferentes espécies (Arai & Fujimoto, 2018). A poliploidia refere-se à presença de múltiplos conjuntos de cromossomos além do padrão diploide, como nos organismos triploides (3n), tetraploides (4n) e hexaploides (6n) (Dunham, 2023). Em peixes, embora esses fenômenos ocorram naturalmente em algumas espécies devido ao processo evolutivo (Borin et al., 2002), a poliploidia também pode ser induzida em laboratório por meio de procedimentos que afetam o desenvolvimento natural dos cromossomos (Arai, 2001). Outra forma de manipulação cromossômica é a produção de progênies de derivação uniparental, ou seja, peixes gerados exclusivamente a partir do genoma paterno ou materno, que são conhecidos como androgênese e ginogênese, respectivamente. Essas tecnologias objetivam produzir animais de alta performance, como linhagens melhoradas, populações monossexuais, e estudar a determinação do sexo em peixes.

A ginogênese é um tipo de reprodução uniparental em que o DNA paterno é eliminado, originando descendentes exclusivamente maternos (Komen & Thorgaard, 2007). A ginogênese clássica envolve duas etapas, a primeira delas é a inativação do material genético dos espermatozoides com radiação não-ionizante (ultravioleta - UV), radiações ionizantes (raios gama ou raios-X) (Arai & Fujimoto, 2018). As radiações não ionizantes são as mais sugeridas

e empregadas, pois oferecem menor risco ao manipulador, além de serem mais efetivas. Para inativar os espermatozoides com radiações não-ionizantes, suspensões de células são mantidos em solução salina ou fluido seminal em camadas finas, devido à baixa penetração da radiação (Arai & Fujimoto, 2018). A fertilização com espermatozoides irradiados gera embriões haploides, que, por não possuírem um genoma completo, geralmente apresentam malformações e não sobrevivem, condição conhecida como “síndrome haploide” (Pan et al., 2017), o que indica que os indivíduos haplóides são inviáveis. Para restaurar o estado diplóide, é realizada a segunda etapa, de diploidização, quando são aplicados choques físicos (temperatura ou pressão) ou químicos. A diploidização pode ocorrer na meiose, inibindo a formação e liberação do segundo corpúsculo polar (Zou et al., 2011), ou na mitose, bloqueando a segunda clivagem celular (Meng et al., 2016).

Na aquicultura, a ginogênese é valorizada por permitir a produção de populações monossexuais ou clonais (Dunham, 2023) e ajudar a entender os mecanismos de determinação sexual nas espécies. No entanto, a técnica ainda apresenta desafios, como baixa sobrevivência, aumento da endogamia e protocolos laboratoriais complexos, dificultando sua aplicação comercial. Em espécies Neotropicais como o lambari-do-rabo-amarelo (*A. altiparanae*), estudos com ginogênese induzida por UV conseguiram produzir ginogenéticos diploides utilizando choque térmico para restaurar a ploidia (Nascimento et al., 2020).

A androgênese, por sua vez, é uma biotecnologia reprodutiva que resulta na transmissão exclusiva do genoma paterno. Para isso, genoma do oócito é previamente inativado por meio de radiação gama, raios X ou radiação ultravioleta (UV), como demonstrado em estudos com a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Komen & Thorgaard, 2007). Esses oócitos, uma vez irradiados, são fertilizados com espermatozoides normais, originando embriões haploides sem contribuição materna. Assim como na ginogênese, é necessário aplicar um choque térmico ou de pressão durante a primeira divisão celular para duplicar o material genético e restaurar a diploidia (Dos Santos, 2017).

A aplicação da técnica de androgênese para reconstituição de peixes tem se mostrado uma estratégia viável na reprodução uniparental, permitindo a geração de indivíduos com material genético exclusivamente paterno (Dos Santos, 2017). Diversos estudos vêm demonstrando o sucesso da indução androgenética em diferentes espécies, por meio da inativação do DNA materno utilizando radiação ultravioleta ou choques térmicos, seguidos de mecanismos para restaurar a diploidia (Arai & Fujimoto, 2018).

Contudo, a duplicação de embriões haploides para obtenção de indivíduos diploides androgenéticos ainda representa um desafio técnico significativo (Komen & Thorgaard, 2007), causando baixas sobrevivências e deformidades. Como alternativa, alguns pesquisadores propuseram o uso de espermatozoides diploides provenientes de peixes tetraploides para induzir a androgênese diretamente, eliminando a etapa de diploidização. Essa abordagem mostrou-se eficaz em espécies como o salmão masu (*Oncorhynchus masou ishikawae*) (Nagoya et al., 2010), a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Thorgaard et al., 1990) e a dojo (*M. anguillicaudatus*) (Yasui et al., 2010).

Buscando otimizar a sobrevivência e simplificar o protocolo, Morishima et al., (2011) desenvolveram a técnica de fertilização a frio em *M. anguillicaudatus*, submetendo oócitos irradiados a um choque térmico entre 0 e 3 °C durante 60 minutos após a fertilização. Embora a fertilização tenha sido bem-sucedida, a eclosão foi baixa, com a maioria dos embriões permanecendo haploides. Estudos subsequentes demonstraram que a utilização de espermatozoides diploides nesse mesmo protocolo resultou na formação de embriões diploides viáveis, evitando a ocorrência da síndrome haploide comumente associada ao uso de espermatozoides (Hou et al., 2013; Yasui et al., 2010). Embora promissora, essa tecnologia ainda não foi empregada em espécies Neotropicais, embora no lambari *Astyanax altiparanae* esse procedimento seja promissor, já que existem indícios de herança uniparental através de choques frios (Adamov et al., 2017).

A escolha da espécie *A. altiparanae* para a aplicação de técnicas biotecnológicas de manipulação cromossômica fundamenta-se em sua ampla distribuição na região Neotropical, adaptabilidade a condições laboratoriais e histórico consolidado de estudos em reprodução e genética. Sua utilização visa inovar estratégias de conservação e manejo de espécies nativas, aproveitando o conhecimento acumulado sobre sua biologia reprodutiva e características genéticas. O trabalho de Yasui et al., (2022) serviu como base para escolha dessas espécies que mostrou as técnicas desenvolvidas na manipulação cromossômica. Os resultados obtidos nessas pesquisas não apenas comprovam a eficiência da técnica, mas também destacam seu potencial na conservação genética, na formação de linhagens isogênicas e em programas de melhoramento na aquicultura.

1.2 LAMBARI (*ASTYANAX ALTIPARANAE*) COMO ESPÉCIE MODELO

O lambari-do-rabo-amarelo, *A. altiparanae* (Garotti, 2000) é uma espécie de pequeno porte, medindo entre 7 e 12 cm, e atualmente se destaca como um organismo modelo

amplamente utilizado em pesquisas de biotecnologia aplicada (Figura 1). A escolha dessa espécie como modelo experimental se deve, em grande parte, ao sucesso na sua reprodução artificial e à viabilidade de obtenção e estocagem de seus gametas, aspectos que foram descritos por Yasui et al., (2015). Esse trabalho pioneiro estabeleceu as bases necessárias para uma série de estudos subsequentes, voltados para aplicações mais avançadas da biotecnologia reprodutiva na espécie.

Figura 1 - Exemplar de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*).



Fonte: Autoria própria.

Entre as pesquisas que se seguiram, destacam-se os estudos relacionados à identificação do momento ideal de extrusão dos oócitos e à liberação do segundo corpúsculo polar, etapa fundamental para protocolos de manipulação cromossômica (Dos Santos et al., 2016). Além disso, avanços importantes foram obtidos na área de larvicultura, contribuindo para o aprimoramento das técnicas de cultivo intensivo da espécie (Bertolini et al., 2018).

Outras contribuições relevantes incluem a produção de indivíduos triploides e tetraploides, que têm aplicação tanto no aumento da eficiência produtiva quanto na preservação ambiental, uma vez que indivíduos estéreis evitam a reprodução descontrolada em ambientes naturais (do Nascimento et al., 2017; Nascimento et al., 2020 a). Complementarmente, também foram desenvolvidos protocolos para obtenção de indivíduos ginogenéticos, o que amplia ainda mais o potencial da espécie em estudos de manipulação reprodutiva e conservação genética (Nascimento et al., 2020).

Dessa forma, *A. altiparanae* se consolidou como um modelo experimental na biotecnologia de peixes, possibilitando o desenvolvimento e a validação de técnicas inovadoras que, posteriormente, podem ser aplicadas em outras espécies de maior porte e valor comercial.

A seleção de *Astyanax altiparanae* para a aplicação de técnicas biotecnológicas envolvendo manipulação cromossômica apoia-se no fato de tratar-se de uma espécie

amplamente distribuída na região Neotropical, com elevada adaptabilidade a ambientes laboratoriais, e consolidada como modelo em estudos de reprodução e genética. Sua utilização visa inovar estratégias de conservação e manejo de espécies nativas, aproveitando o conhecimento acumulado sobre sua biologia reprodutiva e características genéticas. O trabalho de (Yasui et al., 2022) serviu como base para escolha dessas espécies que mostrou as técnicas desenvolvidas na manipulação cromossômica. Não obstante, os resultados obtidos a partir dessa espécie serve de modelo para outras espécies de peixes, sobretudo em caracíformes Neotropicais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e otimizar protocolos de fertilização baseados na aplicação de choques térmicos em diferentes temperaturas da água, com o objetivo de induzir o desenvolvimento androgenético em *Astyanax altiparanae*, contribuindo para o avanço de técnicas biotecnológicas voltadas à reprodução e ao melhoramento genético de peixes neotropicais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar capacidade fecundante através da motilidade espermática em água quente (40°C) e fria (4°C).
- Aplicar tratamentos térmicos (água fria 4°C e água quente 40°C) na ativação dos gametas para indução de androgênese.
- Monitorar as fases desenvolvimento embrionário até a eclosão das larvas.
- Avaliar a ploidia e a origem genética das larvas, normais e anormais, por meio de citometria de fluxo e genotipagem.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL E ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Biotecnologia de Peixes, pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA), vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), localizado em Pirassununga, São Paulo. Todos os procedimentos experimentais

foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do CEPTA (CEUA/CEPTA), sob o protocolo nº 02031.000088/2021-61.

3.2 MOTILIDADE ESPERMÁTICA EM ÁGUA QUENTE E FRIA

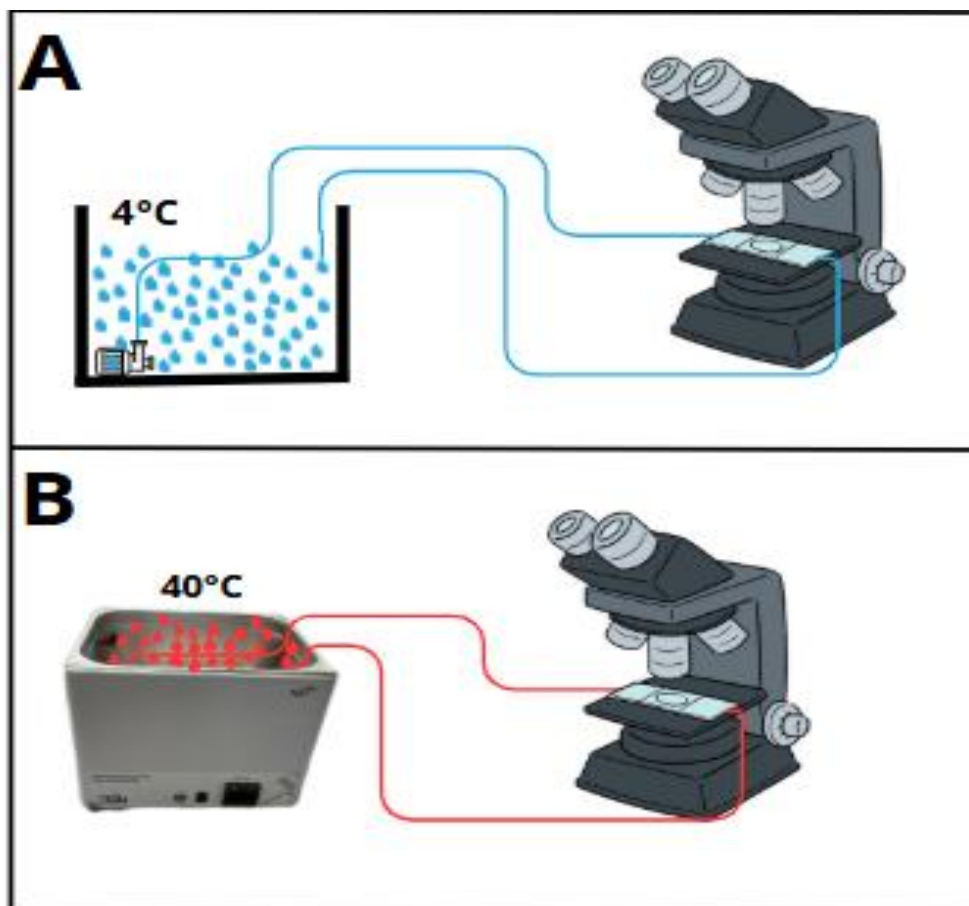
Primeiramente, foram realizados testes de motilidade espermática, para verificar o potencial de fertilização. Machos adultos com peso médio de $8,68 \pm 0,27$ g e medindo em média $6,83 \pm 0,81$ cm, foram submetidos à indução hormonal utilizando extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) com dose única dose de 1,0 mg/kg. Após cinco horas, os animais foram anestesiados com óleo de cravo-da-índia (150 mg/L; Biodinâmica, Hortolândia, Brasil). O sêmen foi coletado com auxílio de uma micropipeta de 1000 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e imediatamente diluído em 500 µL de solução de Ringer modificada (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl₂, 2,1 mM MgCl₂), com o objetivo de promover a imobilização espermática.

A ativação dos espermatozoides foi realizada por meio da adição de água em três grupos: 4°C para o tratamento frio, 40°C para o tratamento quente e 26°C para o grupo controle. Para viabilizar a ativação nas temperaturas quente e fria, foi desenvolvido um modelo adaptado de lâmina, no qual duas lâminas de microscopia foram sobrepostas com pequenos espaçadores, permitindo a passagem de água entre elas e, assim, manter a temperatura desejada durante a análise (Figura 2).

No tratamento frio, utilizou-se um aquário revestido com isopor, ao qual foi adicionado gelo até atingir a temperatura de 4°C. Uma bomba submersa (PULACO PL-118) foi empregada para circular a água por uma mangueira de silicone (diâmetro interno de 4 mm), em sistema de recirculação ao aquário, mantendo um fluxo contínuo. Esse sistema permitiu que a lâmina atingisse a temperatura adequada antes da ativação dos espermatozoides. A temperatura da lâmina foi aferida com um termômetro infravermelho (FLUKE 59 Max IR Thermometer) e, após atingir 4°C, procedeu-se à análise da motilidade. A Figura 02 ilustra o modelo empregado para o tratamento frio.

Para o tratamento quente, foi utilizado um banho-maria digital com circulação interna (7 LAB, Rio de Janeiro, Brasil), com temperatura ajustada para 40°C, e a recirculação da água foi realizada utilizando o mesmo sistema para 4°C. A Figura 2 apresenta o esquema do sistema utilizado para o tratamento quente.

Figura 2 - Representação esquemática do sistema utilizado para avaliação da motilidade espermática em diferentes temperaturas. A – Circulação de água fria (4°C) a partir de um aquário resfriado, passando pela lâmina e retornando ao aquário. B – Circulação de água quente (40°C) a partir de um banho-maria, passando pela lâmina e retornando ao banho-



A seleção das temperaturas de 4°C e 40°C para a ativação dos espermatozoides de *Astyanax altiparanae* foi baseada em uma prévia série de testes experimentais. Observou-se que temperaturas abaixo de 4°C inibiram a motilidade espermática, com completa ausência da motilidade. Por outro lado, temperaturas elevadas, acima de 40 °C, também comprometeram a motilidade dos espermatozoides, levando à perda e a integridade celular. Dessa forma, a faixa térmica entre 4°C e 40°C foi estabelecida como os extremos para temperatura máxima e mínima para a ativação dos espermatozoides.

Para a análise de motilidade espermática, foi pipetado 1 µL de sêmen diluído sobre uma lâmina de microscopia previamente revestida com albumina bovina sérica (BSA) a 0,1%. Os espermatozoides foram ativados com uma diluição de 20× em água destilada. Em seguida, a motilidade espermática foi avaliada utilizando um microscópio (Nikon Ni, Tokyo, Japão), acoplado a uma câmera (Nikon DS-Fi1, Japão), com gravação realizada por meio do software

NIS-Elements AR (Nikon, Tóquio, Japão). A motilidade espermática foi realizada com Análise de Motilidade Computadorizada (CASA) utilizando o software ImageJ, de acordo com os procedimentos empregados em *Danio rerio* (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007) e com adaptações para o lambari *Astyanax altiparanae* (Gonçalves et al., 2018).

Os vídeos obtidos foram processados pelo software CASA, configurado para rastrear automaticamente o movimento individual dos espermatozoides e calcular os parâmetros cinemáticos. Foram avaliados os seguintes indicadores: motilidade total (%), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade linear, $\mu\text{m/s}$), VAP (velocidade média da trajetória, $\mu\text{m/s}$).

3.3 ORIGEM DOS PARENTAIS E INDUÇÃO HORMONAL

Constatada a motilidade espermática a 4°C e 40°C, partiu-se então para os testes de fertilização nessas temperaturas. Foram utilizados cinco fêmeas e dez machos da espécie *A. altiparanae*, coletados diretamente dos tanques de cultivo do CEPTA/ICMBio. A seleção dos reprodutores foi realizada com base em características morfológicas indicativas de maturação sexual. As fêmeas apresentavam abdômen distendido e região ventral avermelhada, sinais típicos de aptidão reprodutiva. Os machos, por sua vez, foram identificados pela presença de espículas na nadadeira anal, conforme descrito por (de Siqueira-Silva et al., 2018).

Após a seleção, os reprodutores foram transferidos para o Laboratório de Biotecnologia de Peixes e mantidos em aquários com capacidade de 40 litros, sob temperatura controlada de 28°C. As fêmeas foram submetidas à indução hormonal utilizando extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), aplicado em duas doses: a primeira, de 0,5 mg/kg, e a segunda, após 5 horas, de 5,0 mg/kg. Os machos receberam uma única dose de 1,0 mg/kg, administrada simultaneamente à segunda dose das fêmeas.

Cinco horas após a aplicação da segunda dose, cinco machos foram anestesiados com óleo de cravo-da-índia (100 mg/L; Biodinâmica, Hortolândia, Brasil) e coletado o sêmen com auxílio de uma micropipeta de 1000 μL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e imediatamente transferido para tubos de 1,5 mL contendo 500 μL de solução de ringer modificada (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl_2 , 2,1 mM MgCl_2). Amostras de nadadeira foram coletadas para análise genética de paternidade. Posteriormente, os machos foram separados das fêmeas, para que pudessem voltar da anestesia e retornados aos tanques onde foram capturados.

Seis horas após a segunda dose hormonal, observou-se comportamento reprodutivo característico, como a natação sincronizada e acelerada do macho com a fêmea na coluna da água. Neste momento, a fêmea foi anestesiada e submetida à extrusão dos oócitos em uma placa

de Petri revestida com filme plástico de PVC, a fim de evitar a aderência dos ovócitos à superfície. A desova foi então dividida igualmente em três béqueres de 50 mL, previamente revestidos com albumina bovina sérica (BSA 0,1%), para realização dos tratamentos de fertilização: fria, quente e controle. Em total cinco machos foram utilizados para coleta de sêmen e outros cinco para ficar junto com as fêmeas e estimular a liberação dos oócitos.

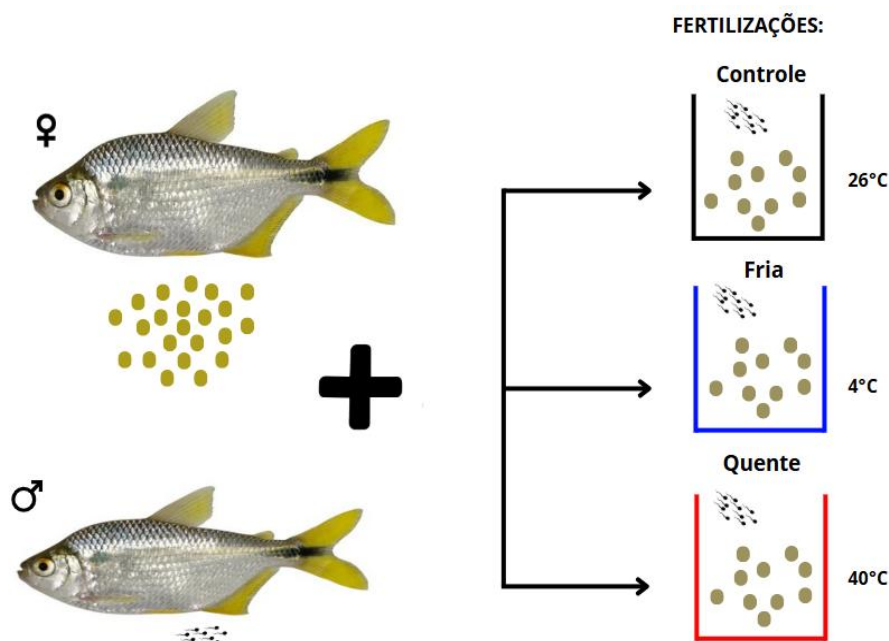
3.4 FERTILIZAÇÃO FRIA E QUENTE

Para o tratamento de fertilização a frio, foi preparado um aquário de 20 litros revestido com isopor, contendo água e gelo até atingir a temperatura de 4°C. O sêmen foi adicionado diretamente sobre a massa de oócitos, seguido pela adição de 5 mL da água fria para ativação dos gametas. A mistura foi homogeneizada suavemente por 2 minutos e mantida na água a 4°C por um período de 35 minutos. Após esse tempo, os ovos foram cuidadosamente transferidos para incubadoras flutuantes e, em seguida, colocados em aquários de 40 litros mantidos a 26°C, onde o desenvolvimento embrionário foi monitorado para saber o número de ovos fertilizados e quantos eclodiram, além da proporção de larvas normais e anormais.

No tratamento de fertilização quente, utilizou-se um banho-maria previamente ajustado à temperatura de 40°C. A mesma água foi utilizada tanto para a ativação dos gametas quanto para manter os ovos imersos por 3 minutos. Finalizado o tempo de exposição, os ovos foram transferidos para aquários de 40 litros mantidos a 26°C, onde permaneceram para acompanhamento do desenvolvimento embrionário.

No grupo controle, o sêmen foi adicionado aos ovócitos e a fertilização foi realizada com água à temperatura ambiente (26°C). Os ovos foram mantidos em aquários de 40 litros sob as mesmas condições térmicas (26°C) para monitoramento do desenvolvimento embrionário, seguindo os mesmos critérios de avaliação aplicados aos demais grupos.

Figura 3 - Procedimentos adotados para a obtenção dos gametas e realização dos protocolos de fertilização. A fertilização controle foi realizada a 26°C, a fertilização fria a 4°C, e a fertilização quente a 40°C.



3.5 CONFIRMAÇÃO DA PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após a eclosão, foram coletadas 131 larvas, das quais 56 apresentaram morfologia normal e 75 exibiram anormalidades. No grupo controle ($n = 50$), observou-se 30 larvas com malformações e 20 normais; na fertilização quente ($n = 50$), 30 eram anormais e 20 apresentavam morfologia normal; por fim, na fertilização fria ($n = 31$), identificaram-se 15 larvas anormais e 16 normais.

O procedimento de citometria de fluxo foi realizado utilizando-se o protocolo desenvolvido para citometria de fluxo em peixes, empregando-se lambaris (Xavier et al., 2017). As larvas foram submetidas a lise celular em uma solução detergente composta por 9,53 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 47,67 mM de KCl, 15 mM de Tris, 74 mM de sacarose e 0,8% de Triton X-100, visando a remoção dos núcleos celulares. A amostra foi então dividida em duas alíquotas: uma destinada à análise de ploidia (60%) e a outra ao teste de paternidade (40%), onde foi adicionado álcool absoluto para conservar o DNA e ser utilizado para a genotipagem.

Para a determinação da ploidia, foram utilizados 700 μL de solução tampão Dulbecco's PBS contendo o corante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol di-hidroclorato (DAPI), na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram filtradas por uma malha de 30 μm (CellTrics,

Partec, Alemanha) e analisadas em um citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer, Partec, GMBh, Alemanha). Antes da leitura das amostras experimentais, foi realizada uma calibração do equipamento utilizando sêmen de *A. altiparanae* como referência para a definição do pico haploide, permitindo assim a identificação precisa da ploidia nas amostras analisadas.

3.6 CONFIRMAÇÃO POR CITOGENÉTICA

Larvas recém-eclodidas foram separadas e mantidas em placa de Petri durante quatro horas em colchicina diluída em água destilada (0,02 g/mL). Após quatro horas, as larvas foram divididas em duas partes, a primeira parte para citometria de fluxo para confirmação da ploidia e genotipagem para teste de paternidade, e a segunda parte para citogenética. As larvas foram dissociadas em placa de Petri e a região cefálica transferidas para Becker (5 mL) contendo 0,8 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M). O material foi transferido para uma estufa a 37°C e incubado por 50 minutos. Posteriormente, as amostras foram retiradas da estufa e separadas em micro tubos (1,5 ml), sendo adicionado fixador metanol e ácido acético (3:1), até atingir 0,8 mL. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (1200 rpm) por dez minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado e adicionado novamente o fixador até atingir 0,8mL. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Finalizada a centrifugação a amostra foi separada em microtubo e adicionado 0,2 mL de fixador. Para confecção das lâminas, parte da suspensão celular (10 – 15 µL) foi pingada com auxílio de uma micropipeta (Eppendorf, Hamburg, Germany) diretamente em uma lâmina de vidro limpa. As lâminas foram coradas em solução de Giemsa a 5%, durante 10 minutos. As lâminas foram visualizadas em microscópio (Nikon Ni, Tokyo, Japan) por meio do software Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão), sendo as metáfases de melhor qualidade identificadas e fotografadas (Foresti et al., 1993).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

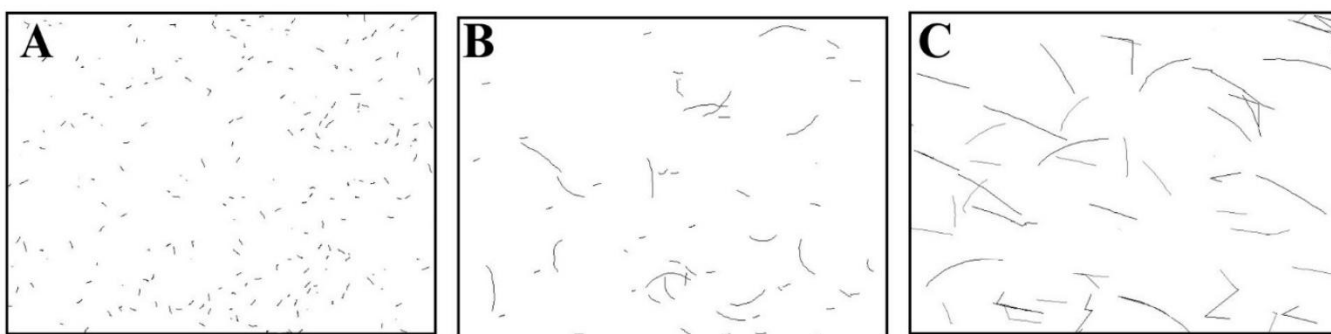
Os dados coletados foram analisados com o auxílio do software Statistica, versão 10.0 (StatSoft, EUA), e os resultados foram expressos como média acompanhada do erro padrão da média (EP). Para verificar se os dados seguiam uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Lilliefors. Em seguida, as comparações entre os grupos foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Considerou-se um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA EM ÁGUA QUENTE E FRIA

A Figura 4 apresenta a trajetória dos espermatozoides de *Astyanax altiparanae* registrada durante um intervalo de 1 segundo sob diferentes temperaturas de ativação. Observa-se que, a 4°C (Figura 4 B), os trajetos foram mais curtos, indicando menor deslocamento e, consequentemente, menor velocidade espermática. A 26°C (Figura 4 A), as trajetórias foram visivelmente mais extensas, enquanto a 40°C (Figura 4 C) apresentou os maiores deslocamentos entre todas as condições testadas. Esses padrões visuais corroboram os dados quantitativos de motilidade e velocidade, evidenciando uma relação positiva entre o aumento da temperatura e a intensidade da movimentação espermática.

Figura 4 - Trajetória dos espermatozoides de *Astyanax altiparanae* durante 1 segundo de motilidade, após ativação com água a 4°C (A), 26°C (B) e 40°C (C).



A motilidade espermática (MOT) e os parâmetros cinemáticos VCL (velocidade curvilínea), VMD (velocidade média de deslocamento) e VLR (velocidade em linha reta) de *Astyanax altiparanae* variaram significativamente em função do tempo após a ativação e da temperatura do tratamento (controle, quente e frio).

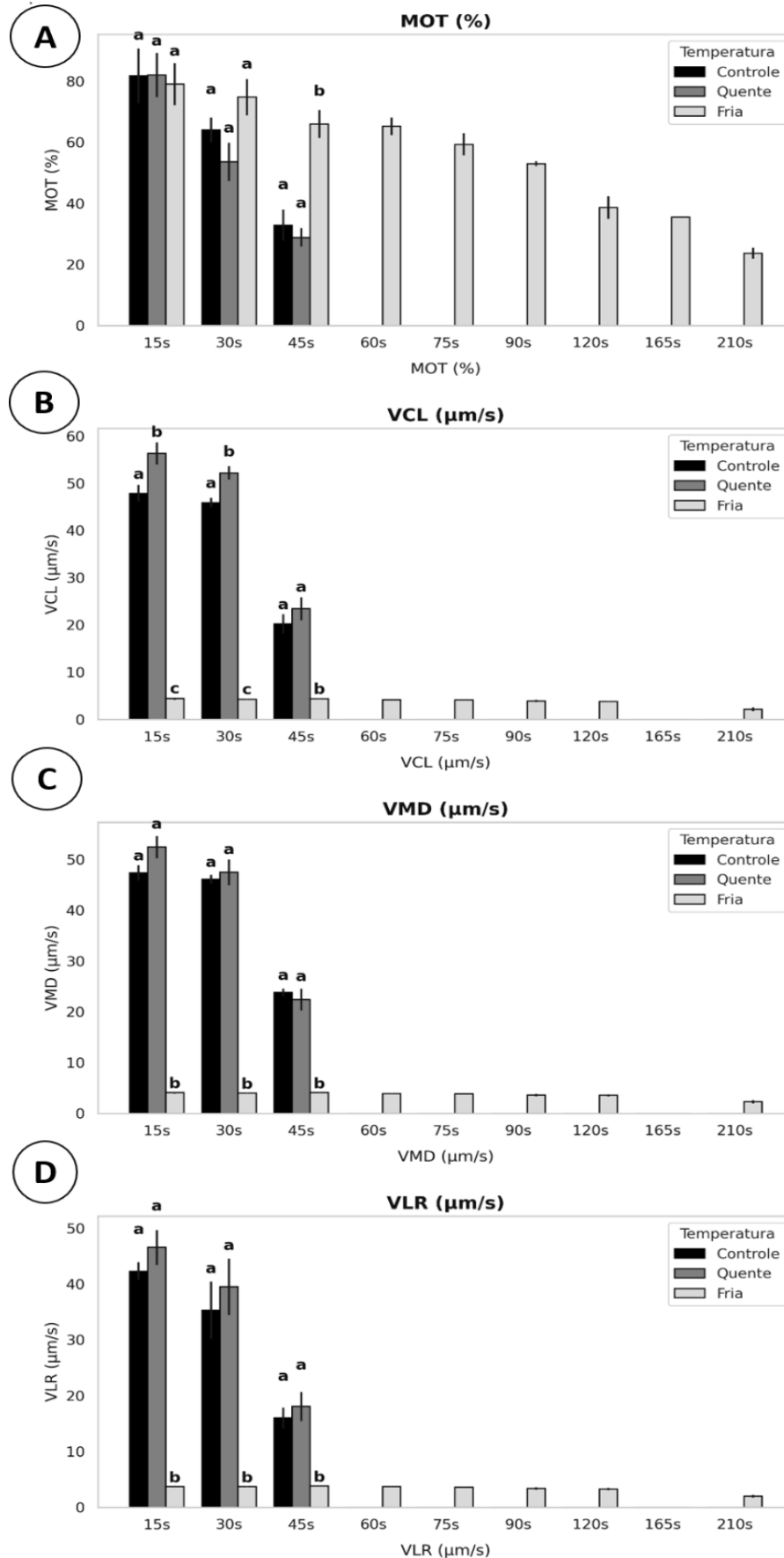
Até 45 segundos após a ativação, foi possível comparar estatisticamente os três tratamentos. A motilidade (MOT) apresentou valores elevados aos 15 segundos, com médias superiores a 79% em todos os tratamentos e sem diferenças significativas entre eles ($P = 0.9567$). No entanto, aos 45 segundos, o tratamento frio apresentou motilidade significativamente maior ($P = 0.0017$) que os demais, com média de 66,1%, enquanto os tratamentos controle e quente apresentaram valores reduzidos (32,9% e 28,9%, respectivamente) (Figura 5 A).

Em relação à velocidade curvilinear (VCL), o tratamento quente apresentou os maiores valores aos 15 e 30 segundos (56,36 $\mu\text{m/s}$ e 52,22 $\mu\text{m/s}$, respectivamente), sendo significativamente superior ao tratamento controle, que por sua vez foi superior ao tratamento frio ($P = 0.0001$). A partir dos 45 segundos, a VCL no tratamento frio manteve-se baixa ($\sim 4,35 \mu\text{m/s}$), mas constante, enquanto os demais tratamentos apresentaram valores nulos a partir dos 60 segundos (Figura 5 B).

Para o parâmetro velocidade média de deslocamento (VMD), comportamento semelhante foi observado. O tratamento frio apresentou valores baixos, porém sustentados até 210 segundos, enquanto os tratamentos controle e quente apresentaram cessação completa da velocidade média já a partir dos 60 segundos (Figura 5 C). Já a velocidade em linha reta (VLR) seguiu a mesma tendência, com o tratamento frio mantendo valores entre 3,26 $\mu\text{m/s}$ e 3,79 $\mu\text{m/s}$ até 120 segundos, enquanto os demais atingiram valores nulos logo após os 45 segundos (Figura 5 D).

A partir de 60 segundos após a ativação, apenas o tratamento Frio apresentou espermatozoides com motilidade detectável. Os tratamentos controle e quente apresentaram motilidade igual a zero a partir desse ponto, inviabilizando a comparação estatística. Os dados referentes ao tratamento frio entre 60 e 210 segundos foram apresentados de forma descritiva, evidenciando a persistência da motilidade em baixa temperatura por um período prolongado.

Figura 5 - Motilidade espermática e parâmetros cinemáticos de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas (Controle, Quente e Frio) ao longo do tempo após a ativação. (A) Motilidade (%); (B) Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$); (C) Velocidade média de deslocamento (VMD, $\mu\text{m/s}$); (D) Velocidade em linha reta (VLR, $\mu\text{m/s}$). Os dados representam média $\pm$ erro padrão ($n = 3$). As letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em cada tempo (ANOVA; $P < 0,05$). A partir de 60 segundos, apenas o tratamento Frio apresentou motilidade, sendo os dados apresentados de forma descritiva.



4.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E SOBREVIVÊNCIA

Os dados sobre os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae*, fertilizados com água em diferentes temperaturas, estão apresentados na Tabela 1. Houve diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,0001$) para os seguintes estágios: não fertilizados, clivagem, blástula, gástrula, somito e eclosão. A análise mostrou que o grupo controle e o grupo fertilizado com água quente não apresentaram diferenças estatísticas nesses estágios. Por outro lado, o tratamento com água fria resultou em percentuais significativamente menores em todos os estágios embrionários após a fertilização.

Em relação ao percentual de larvas normais, foi identificado um declínio progressivo: do grupo controle (76,48%) para o grupo com água quente (47,79%) e, por fim, o grupo com água fria (7,50%). Todas essas diferenças foram estatisticamente significativas ($P = 0,0001$). No entanto, quando se analisou a proporção de larvas com anomalias, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($P = 0,2561$) (Tabela 1).

Tabela 1- Desenvolvimento embrionário do lambari do rabo amarelo (*Axtyanax altiparanae*) após fertilização do controle (26°C), fria (4,0°C) e quente (40°C).

Tratamentos (ovos)	Não-fertilizados	Clivagem (%)	Blastula (%)	Gastrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)
Controle (573)	36,05 ± 7,81 ^a	63,95 ± 7,81 ^a	59,61 ± 8,88 ^a	58,38 ± 8,80 ^a	55,75 ± 9,07 ^a	51,53 ± 9,80 ^a	76,48 ± 3,96 ^a	23,52 ± 3,96 ^a
Fertilização Quente (559)	36,16 ± 7,96 ^a	61,82 ± 7,91 ^a	56,22 ± 7,82 ^a	49,60 ± 8,45 ^a	38,61 ± 8,72 ^a	32,60 ± 7,96 ^a	47,79 ± 4,70 ^b	53,21 ± 4,70 ^a
Fertilização Fria (512)	88,92 ± 3,00 ^b	11,08 ± 3,00 ^b	9,04 ± 2,99 ^b	6,93 ± 2,14 ^b	3,82 ± 1,56 ^b	2,30 ± 1,75 ^b	7,50 ± 7,50 ^c	92,50 ± 7,50 ^a
<i>P - valor</i>	0,0001	0,0001	0,0004	0,0006	0,0009	0,0017	0,0001	0,2561

*Distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey test (ANOVA, $P < 0,05$).

4.3 CONFIRMAÇÃO DA PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Conforme esperado, a análise de ploidia por citometria de fluxo indicou que todos os indivíduos do grupo controle eram diploides (2n), confirmando a eficácia do método de referência. Nos grupos submetidos aos tratamentos térmicos, observou-se uma variação significativa na ploidia das larvas. No grupo fertilizado com água quente, dentre as 50 larvas analisadas, foram identificadas 14 haploides (1n), 9 diploides (2n) e 27 triploides (3n). De forma semelhante, o grupo fertilizado com água fria apresentou 14 haploides, 2 diploides e 15 triploides (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado da citometria de fluxo do controle, da fertilização fria e fertilização quente.

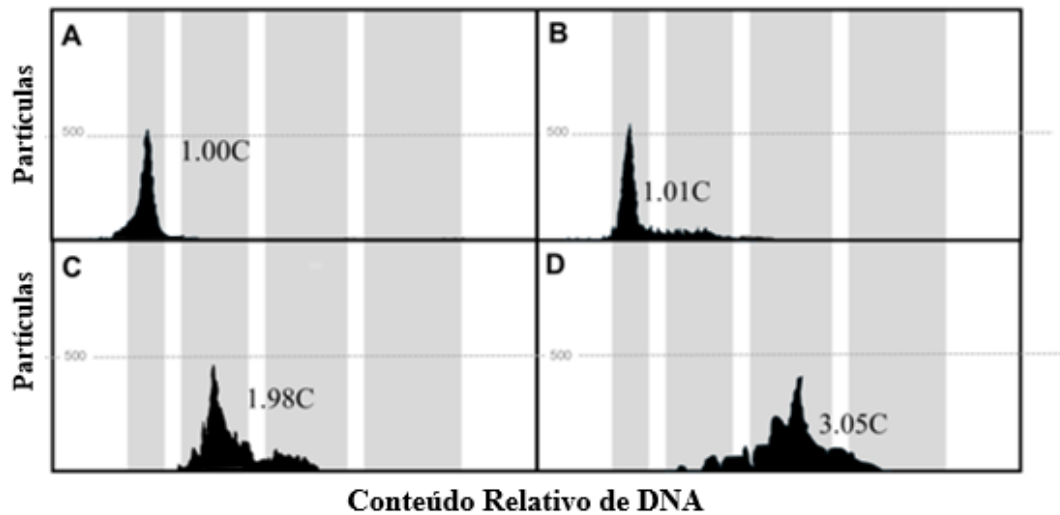
Tratamento	Ploidia			N° de larvas	
	1n	2n	3n	Normal	Anormal
Controle	-	50	-	30	20
Fert. Fria	14	2	15	16	15
Fert. Quente	14	9	27	20	30

As análises revelaram que ambos os tratamentos térmicos (frio e quente) resultaram em perfis de ploidia distintos do grupo controle, com um percentual expressivo de larvas anormais. No tratamento com fertilização quente, foi analisada 30 larvas anormais, em que a maioria eram haploide ($n = 14$), e o restante eram triploides ($n = 11$) e diploides ($n = 5$) com algum grau de deformidade. Já entre as 20 larvas consideradas normais, predominavam os triploides ($n = 16$), enquanto apenas 4 eram diploides (Tabela 3).

A Figura 6 ilustra os histogramas de fluorescência utilizados para a determinação da ploidia das larvas. O sêmen haploide de lambari foi empregado como padrão de

referência para o ajuste dos histogramas e identificação dos demais picos correspondentes às ploidias $2n$ e $3n$.

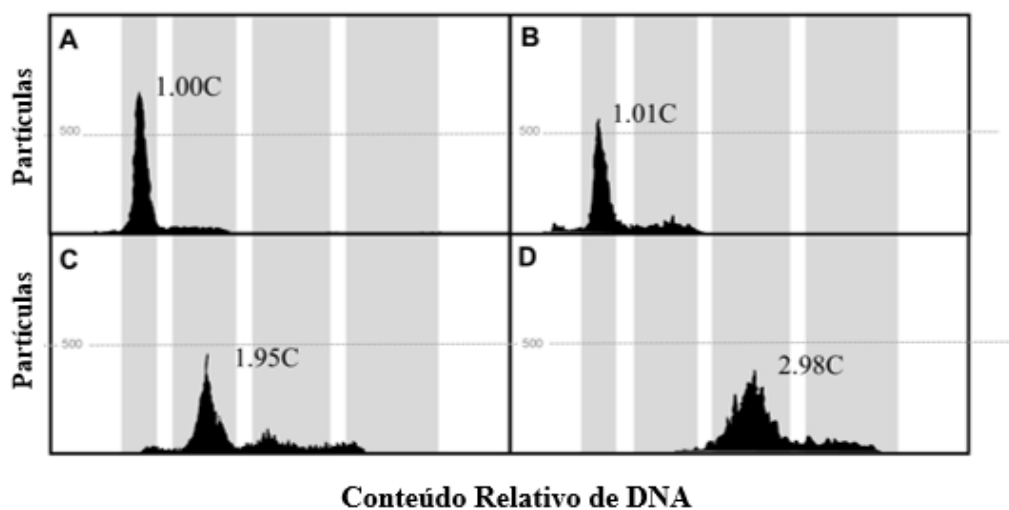
Figura 6 - Histogramas de citometria de fluxo representando o conteúdo relativo de DNA após fertilização a quente (40°C); A – sêmen haploide; B – larvas haploides; C – larvas diploides; D – larva triploide.



Fonte: Autoria própria.

Após a análise das amostras por citometria de fluxo, observou-se que, dentre as 15 larvas com morfologia anormal obtidas na fertilização fria, 14 apresentaram ploidia haploide e uma foi identificada como triploide. Entre as larvas morfologicamente normais, foram detectadas duas diploides e 14 triploides.

Figura 7 - Histogramas de citometria de fluxo representando o conteúdo relativo de DNA após fertilização a frio (4°C). A – sêmen haploide; B – larvas haploides; C – larvas diploides; D – larvas triploides.

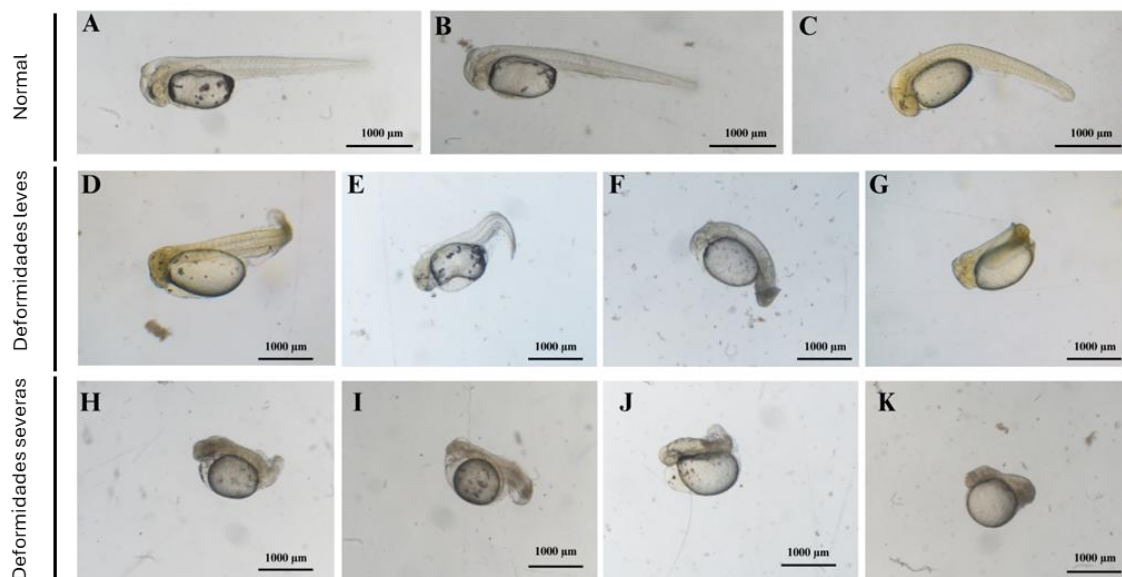


Fonte: Autoria própria.

A Figura 8 apresenta exemplos de larvas com morfologia normal e anormal. Observou-se que, tanto na fertilização fria quanto no quente, as larvas morfológicamente normais tendem a ser diploides ou triploides. Por outro lado, as larvas anormais apresentaram maior variabilidade de ploidia. Na fertilização fria, larvas com deformidades leves foram majoritariamente triploides, enquanto na fertilização quente foram encontradas tanto larvas diploides quanto triploides, conforme já descrito anteriormente.

Nas larvas com deformidades severas, predominou a ocorrência da chamada "síndrome haploide", caracterizada pela presença de material genético proveniente de apenas um dos parentais (materno ou paterno), resultando em indivíduos haploides inviáveis, que geralmente morrem em poucas horas devido à ausência de genes essenciais. No entanto, mesmo entre larvas com alta deformação, também foram identificados alguns indivíduos triploides.

Figura 8 - Exemplos de larvas com diferentes graus de deformidade morfológica. A e B – Larvas com morfologia normal. C, D, E e F – Larvas com deformidades leves. G, H, I, J e K – Larvas com deformidades severas.

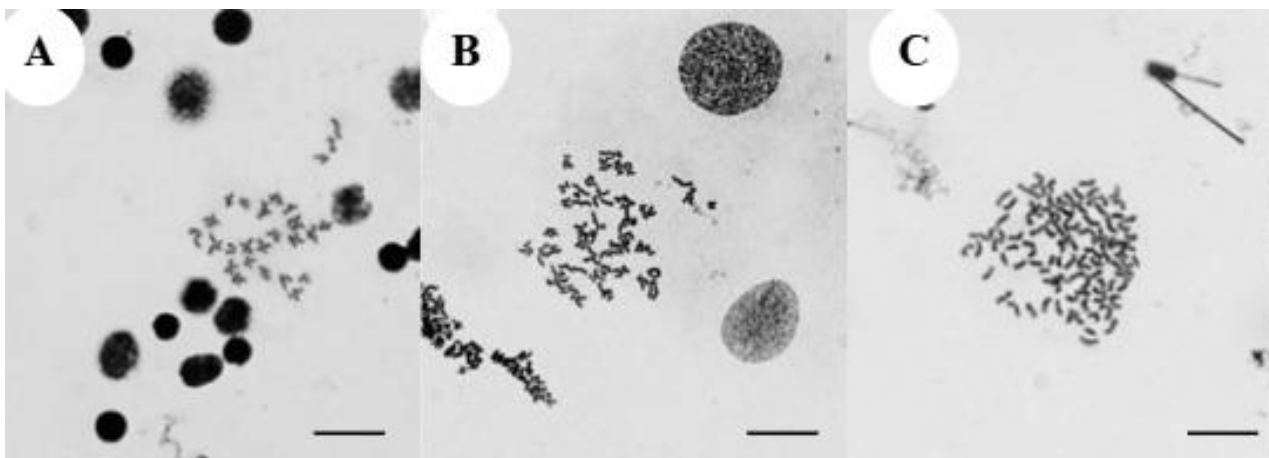


Fonte: Autor própria.

4.4 CITOGENÉTICA

A ploidia também foi confirmada por preparações cromossômicas, por meio de contagem de cromossomos em metáfase. Como esperado, a se julgar pelos resultados de citometris de fluxo, foram confirmadas as presenças de larvas haploides, diploides e triploides de *Astyanax altiparanae* apresentando 25, 50 e 75 cromossomos respectivamente.

Figura 9 - Cromossomos metafásicos das larvas de *Astyanax altiparanae*, A – haploide; B – diploide; C – triploide.



5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que é possível induzir a produção de indivíduos presuntivamente androgenéticos em *Astyanax altiparanae* utilizando apenas o choque térmico, sem a necessidade de irradiar os oócitos. Esta abordagem representa um avanço importante, especialmente por se tratar do primeiro registro conhecido da aplicação dessa técnica na região Neotropical, tornando-a inédita no contexto da biodiversidade local. Além disso, destaca-se o potencial da androgênese induzida por choque frio e quente como uma ferramenta biotecnológica promissora para a geração de lotes monossexuais, o que é particularmente valioso para a aquicultura comercial, produzindo lotes de indivíduos só machos. Em muitas espécies de peixes, um dos sexos apresenta desempenho zootécnico superior, sendo mais vantajoso para o cultivo (Reis et al., 2016), o que reforça a aplicabilidade prática da técnica desenvolvida.

Inicialmente, foi avaliada a qualidade dos espermatozoides por meio da análise de motilidade espermática, com o objetivo de garantir a viabilidade dos gametas utilizados nos experimentos subsequentes. Os dados demonstraram que, embora a temperatura de ativação não tenha influenciado significativamente a porcentagem de motilidade dos espermatozoides, foi afetada de forma expressiva na duração da mesma. Portanto, essa não seria a causa dos valores de fertilização encontrados no presente trabalho. O tratamento a 4 °C resultou em maior tempo de motilidade, o que pode estar relacionado à menor taxa metabólica dos espermatozoides em baixas temperaturas (Dadras et al., 2017).

Os parâmetros de VCL, VMD e VLR, foram significantes menores no tratamento de 4°C, quando comparados ao controle (26°C) e o tratamento a 40°C, demonstrando que a velocidade influenciou na fertilização dos oócitos, como foi visto no tratamento a 4°C se obteve 11% de fertilização, sugerindo que um dos principais fatores é o VCL, que ajuda o espermatozoide encontrar e micrópila do oócito para fertilização. Os resultados demonstram que quanto menor for o VCL menor será a o número de oócitos fertilizados, ou seja, uma relação diretamente proporcional. Foi visto que o deslocamento dos espermatozoides no tratamento a 4°C, dentro de 1 segundo foi significante menor que os outros tratamentos, mostrando que influenciou na motilidade que teve maior tempo e menor fertilização.

Tradicionalmente, a indução da androgênese em peixes é realizada por meio da irradiação dos oócitos, método amplamente descrito na literatura (Arai, 2001). No entanto, essa abordagem apresenta desafios significativos, principalmente relacionados à

manutenção da qualidade dos ovócitos durante e após a exposição à radiação (Hou et al., 2014). Após a irradiação do oócito, método bastante traumático e que torna os oócitos bastante frágeis, após a fertilização é utilizado o choque de temperatura ou pressão para recuperar a ploidia e produzir androgenéticos diploides (Dos Santos, 2017), reduzindo significativamente a sobrevivência sendo ainda uma limitação recorrente nos protocolos de indução à androgênese.

Como observado por Lin & Dabrowski, (1998), a indução da haploidia pode resultar em elevadas taxas de malformações corporais em larvas, fenômeno conhecido como “Síndrome Haploide”. No presente estudo, larvas anormais haploides foram identificadas por meio da análise em citometria de fluxo, mostrando que aquelas larvas com maus formações, mostraram diferenças significativas no conteúdo de DNA em comparação com o grupo controle.

Embora o uso do choque frio para indução de androgênese já tenha sido testado em outras espécies, como *Misgurnus anguillicaudatus* (Morishima et al., 2011), seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Uma das hipóteses é que o choque frio interrompe a segunda divisão meiótica, impedindo a extrusão adequada do segundo corpúsculo polar. Essa falha pode resultar na exclusão completa do material genético materno, permitindo que apenas o núcleo espermático permaneça no citoplasma, iniciando o desenvolvimento de um embrião androgenético.

Morishima et al., (2011) descreveram quatro padrões distintos de extrusão do segundo corpúsculo polar em oócitos submetidos ao choque frio. Em um dos casos mais relevantes, o núcleo do oócito é eliminado juntamente com o corpúsculo polar, deixando apenas o pronúcleo masculino no interior do oócito. Esse fenômeno confirma a viabilidade da indução de androgênese a partir de manipulação térmica, sem a necessidade de métodos mais invasivos, como a radiação. Portanto, mesmo fenômeno pode ocorrer na indução por choque quente, o que será preciso ser mais investigado no futuro.

Morishima et al., (2011) na sua segunda suposição relatam que o corpúsculo polar é liberado e o núcleo feminino permanece imediatamente abaixo dele, o que conduz à formação normal do pronúcleo materno e posterior pronúcleo zigótico diploide, resultando em desenvolvimento embrionário habitual. Na terceira suposição ocorre a extrusão irregular: o equador metafásico aparece desalinhado e o material nuclear se

estende desde a superfície do óvulo até o corpúsculo polar, gerando padrões aberrantes que frequentemente levam a embriões aneuploides ou mosaicos. Na sua quarta suposição observa-se a supressão completa da extrusão: o corpúsculo polar é liberado e o núcleo permanece dentro do óvulo, promovendo retenção total do material genético materno junto ao pronúcleo masculino, resultando em zigotos triploides.

Nesse trabalho observamos que aconteceram duas suposições de Morishima et al., (2011) a primeira foi quando foram identificadas as larvas com síndrome haploide através da citometria de fluxo e a outra suposição foi quando foram identificados os triploides que provavelmente foi feito a retenção do segundo corpúsculo polar.

Essas tecnologias aqui descritas têm grande potencial para a aplicação na constituição de linhagens, e também de indivíduos supermachos (YY), que são capazes de gerar populações monossexuais masculinas após o simples cruzamento com fêmeas comuns genéticas (XX). Esse procedimento é muito empregado em tilápias, sobretudo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Portanto, a tecnologia gerada no presente trabalho têm ampla aplicação nas ciências básicas e aplicadas, sobretudo na produção aquícola.

6 CONCLUSÃO

- Viabilidade da técnica:

Os resultados obtidos indicam que a aplicação de choque térmico no momento da fertilização é uma abordagem viável para a produção de indivíduos androgenéticos.

- Potencial da indução de androgênese:

A indução da androgênese por meio de choque térmico mostra-se uma alternativa promissora para:

Estudos de reprodução em peixes;

Programas de melhoramento genético.

- Avaliação da motilidade espermática (sistema CASA):

Espermatozoides em água fria apresentaram maior tempo de motilidade em comparação aos demais tratamentos;

Contudo, exibiram movimentação mais lenta, o que afetou negativamente a fertilização dos oócitos;

Essa condição resultou em redução significativa na quantidade de oócitos fertilizados.

- Originalidade e relevância dos resultados:

Os achados deste estudo são inéditos e reforçam o potencial do choque térmico como alternativa viável para a indução de androgênese em peixes neotropicais.

- Perspectivas futuras:

A padronização e o aperfeiçoamento da técnica de choque térmico podem:

Ampliar significativamente sua aplicação em programas de conservação genética;

Contribuir para o aprimoramento da produção aquícola.

7 REFERÊNCIAS

- Albert, J. S., Tagliacollo, V. A., & Dagosta, F. (2020). Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. In *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* (Vol. 51). <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032>
- Arai, K. (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197(1–4). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00588-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00588-9)
- Arai, K., & Fujimoto, T. (2018). Chromosome Manipulation Techniques and Applications to Aquaculture. In *Sex Control in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1002/9781119127291.ch6>
- Basavaraju, Y. (2022). Monosex population in aquaculture. In *Frontiers in Aquaculture Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91240-2.00012-9>
- Bertolini, R. M., Senhorini, J. A., Nascimento, N. F. do, Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Peres, W. A. M., Silva, R. C. da, & Yasui, G. S. (2018). First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. *Aquaculture Research*, 49(1). <https://doi.org/10.1111/are.13433>
- Borin, L. A., Martins-Santos, I. C., & Oliveira, C. (2002). A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): Mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. *Genetica*, 115(3). <https://doi.org/10.1023/A:1020667526552>
- Dadras, H., Dzyuba, B., Cosson, J., Golpour, A., Siddique, M. A. M., & Linhart, O. (2017). Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. In *Aquaculture Research* (Vol. 48, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/are.13049>
- de Siqueira-Silva, D. H., Saito, T., dos Santos-Silva, A. P., da Silva Costa, R., Psenicka, M., & Yasui, G. S. (2018). Biotechnology applied to fish reproduction: tools for conservation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(6). <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0506-0>

- do Nascimento, N. F., Pereira-Santos, M., Piva, L. H., Manzini, B., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., Yasui, G. S., & Nakaghi, L. S. O. (2017). Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. *Aquaculture*, 471. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.007>
- Dos Santos, M. P. (2017). *Tese de Doutorado Androgênese em Astyanax altiparanae: Ferramenta de Reconstituição em Peixes*.
- Dos Santos, M. P., Yasui, G. S., Xavier, P. L. P., De MacEdo Adamov, N. S., Do Nascimento, N. F., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., & Nakaghi, L. S. O. (2016). Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). *Zygote*, 24(6). <https://doi.org/10.1017/S0967199416000101>
- Dunham, R. A. (2023). Aquaculture and fisheries biotechnology: Genetic approaches: Third edition. In *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches: Third Edition*. <https://doi.org/10.1079/9781789243468.0000>
- Evangelista, M. M., Sussel, F. R., & Romagosa, E. (2019). Environmental manipulation on *astyanax altiparanae* out-of-season spawning. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(2). <https://doi.org/10.3856/vol47-issue2-fulltext-9>
- Foresti, F., Oliveira, C., & Foresti de Almeida-Toledo, L. (1993). A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*, 49(9). <https://doi.org/10.1007/BF01923555>
- Garcia, Y. (n.d.). *BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE Astyanax lacustris: AVALIAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL EM CULTIVO*.
- GARUTTI, V. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei : Characidae) da bacia do alto rio Parana e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comm. Mus. Cienc. Tecnol.*, 13, 65–88. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570291224782050688.bib?lang=ja>
- Goswami, M., Trudeau, V. L., & Lakra, W. S. (2022). Biotechnology in modern aquaculture: Innovations, advancements, and challenges. In *Frontiers in Aquaculture Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91240-2.00003-8>

- Hou, J., Fujimoto, T., Yamaha, E., & Arai, K. (2013). Production of androgenetic diploid loach by cold-shock of eggs fertilized with diploid sperm. *Theriogenology*, 80(2). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.014>
- Hou, J., Saito, T., Fujimoto, T., Yamaha, E., & Arai, K. (2014). Androgenetic doubled haploids induced without irradiation of eggs in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquaculture*, 420–421. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.021>
- ICMBio. (2018). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção volume vi – peixes 2018*.
- Komen, H., & Thorgaard, G. H. (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. In *Aquaculture* (Vol. 269, Issues 1–4). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.009>
- Lin, F., & Dabrowski, K. (1998). Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): Evaluation using flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development*, 49(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199801\)49:1<10::AID-MRD2>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199801)49:1<10::AID-MRD2>3.0.CO;2-R)
- Meng, Z., Liu, X., Liu, B., Hu, P., Jia, Y., Yang, Z., Zhang, H., Liu, X., & Lei, J. (2016). Induction of mitotic gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 451. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.010>
- Morishima, K., Fujimoto, T., Sato, M., Kawae, A., Zhao, Y., Yamaha, E., & Arai, K. (2011). Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to induce androgenesis in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), a teleost fish. *BMC Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-116>
- Nagoya, H., Kawamura, K., & Ohta, H. (2010). Production of androgenetic amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* with dispermy fertilization. *Fisheries Science*, 76(2). <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0224-8>
- Nascimento, N. F. Do. (2015). *Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (Astyanax altiparanae)*.
- Nascimento, N. F. do, Monzani, P. S., Pereira-Santos, M., Niedzielski, D., Senhorini, J. A., Silva, L. A., Nakaghi, L. S. O., & Yasui, G. S. (2020). The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*)

- as a model organism. *Aquaculture*, 514.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734432>
- Pan, Z. J., Zhu, C. K., Wang, H., Chang, G. L., Ding, H. Y., Qiang, X. G., & Yu, X. S. (2017). Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety. *Aquaculture Research*, 48(11). <https://doi.org/10.1111/are.13388>
- PEIXE BR, P. (n.d.). *ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2024 ANUÁRIO 2024*.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. In *Aquaculture* (Vol. 293, Issues 3–4).
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.036>
- Reis, V. R., Loureiro De Almeida, F., & Piferrer, F. (2016). Produção de populações monossexo em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 40(1).
- Thorgaard, G. H., Scheerer, P. D., Hershberger, W. K., & Myers, J. M. (1990). Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. *Aquaculture*, 85(1–4). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90021-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90021-E)
- Winemiller, K. O., Agostinho, A. A., & Caramaschi, É. P. (2007). Fish Ecology in Tropical Streams. In *Tropical Stream Ecology*. <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50007-8>
- Yasui, G. S., Ferreira do Nascimento, N., Pereira-Santos, M., Santos Silva, A. P. dos, Coelho, G. C. Z., Visintin, J. A., Porto-Foresti, F., Okada Nakaghi, L. S., Vianna, N. C., Carvalho, G. B., Monzani, P. S., López, L. S., & Senhorini, J. A. (2022). Establishing a model fish for the Neotropical region: The case of the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* in advanced biotechnology. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.903990>
- Yasui, G. S., Fujimoto, T., & Arai, K. (2010). Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. *Aquaculture*, 308(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.041>

- Yasui, G. S., Senhorini, J. A., Shimoda, E., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., & Silva, L. A. (2015). Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, 9(3), 464–470. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002511>
- Zaganini, R. L., Hashimoto, D. T., Pereira, L. H. G., Oliveira, C., Mendonça, F. F., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2014). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. *Journal of Genetics*, 93. <https://doi.org/10.1007/s12041-012-0143-9>
- Zou, Y. C., Wei, Q. W., & Pan, G. B. (2011). Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) and its confirmation using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01681.x>