



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

São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

TESE DE DOUTORADO

Transplante interespecífico de espermatogônia tronco de piracanjuba
Brycon orbignyanus

Lucia Suárez López

**Doutoranda no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Zoologia)**

**Botucatu
2022**

**TRANSPLANTE INTERESPECÍFICO DE ESPERMATOGÔNIA
TRONCO DE PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus***

LUCIA SUÁREZ LÓPEZ

Orientador:

Prof. Dr. José Augusto Senhorini

Coorientadores:

Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Prof. Dr. Paulo Sergio Monzani

Tese 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 Doutor
em Ciências Biológicas – Zoologia.

Botucatu–SP

2022

L864t López, Lucia Suárez
Transplante interespecífico de espermatogônia tronco de
piracanjuba Brycon orbignyanus / Lucia Suárez López. -- Botucatu,
2022
133 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: José Augusto Senhorini
Coorientador: George Yasui

1. Quimera germinativa. 2. Manipulação cromossômica. 3.
Hibridação entre espécies. 4. Esterilização química. 5. Espécie
ameaçada. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Meus mestres, Tese 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 Doutor em Ciências Biológicas – Zoologia.

possível o desenvolvimento dos meus estudos de mestrado e doutorado no Laboratório de Biotecnologia de Peixes. Também agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu pela oportunidade de ingresso no doutorado e ao coordenador e funcionários pelo apoio, instruções e paciência.

Agradeço a meu orientador o Dr. José Augusto Senhorini pela oportunidade, paciência, confiança e por estar sempre disposto a me ouvir. Agradeço também ao Dr. Paulo Sérgio Monzani por sua imensa contribuição intelectual e técnica para realização deste trabalho, além de sua amizade e confiança, não tenho palavras para agradecer.

Ao Dr. Diógenes Henrique de Siqueira Silva, por sua grande disponibilidade e auxílio em questões técnicas, possibilitando o melhor andamento deste trabalho.

A China Three Gorges Corporation (CTG), Brasil 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, materiais, licença para as coletas e ao uso do alojamento durante todo o tempo de mestrado e parte de doutorado. Ainda agradeço aos pesquisadores e funcionários pelo apoio e amizade, muito obrigada.

Agradeço a todos que estiveram no Laboratório de Biotecnologia de Peixes desde o início de meus estudos de pos-graduação, Nivaldo Ferreira do Nascimento, Mariana Machado Evangelista, Rafaela Manchin Bertolini, Bruna dos Santos Machado, Dilberto

Ribeiro Arashiro, Nycolas Pereira, Natália G. Matheus, Gabriella Carvalho, Geovanna Coelho, Jhennifer Gomes, Gabriel Marra, Andreoli Correia Alves, Milena Chaguri, Amanda Pereira Silva, Giselle Pessoa, Hatus Siqueira, Gustavo Shiguemoto, Natália R. de Alcântara Rocha, Talita Lázaro, Matheus Pereira dos Santos e Daniela José de Oliveira, por sua amizade e companheirismo, dentro e fora do laboratório.

Em especial agradeço a Paulo Sérgio Monzani e Geovanna Coelho pela amizade e por sempre estarem dispostos a ouvir e compartilhar ideias nos momentos difíceis, nos quais nada daria certo.

Agradeço também Natália R. de Alcântara, Talita Lázaro, Rafaela Bertolini, Bruna dos Santos Machado, Milena Chaguri, Gabriella Carvalho, Amanda Pereira pela sua amizade e parceria em momentos difíceis.

Agradeço também a família Bertolini, por terem me acolhido e me fazer sentir parte integrante da família todo este tempo, pela amizade e apoio no momentos difíceis, não tenho palavras para agradecer.

Especialmente agradeço a meus pais José del Carmen Suárez Rivera e Josefa López Vidal, minhas irmãs Ana Cristel e Patricia Suárez López por sempre aceitarem minhas escolhas e por ter me deixado a maior herança de todas, minha educação, e me ensinado tudo o que preciso para poder enfrentar os desafios da vida.

Por fim, a Deus, pela sabedoria e paciência para poder desenvolver este trabalho.

Dedico

A minha avó, tia e tios dos quais não tive a oportunidade de me despedir, algum dia a gente se encontra.

RESUMO GERAL

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie em categoria de perigo de extinção devido a ações antrópicas, como o desmatamento ciliar e a fragmentação dos rios. A associação das biotécnicas de geração de bancos genéticos *in vitro*, utilizando células germinativas primordiais ou células germinativas (espermatogônia ou oogônia-tronco), e do transplante destas células em receptores estéreis é uma estratégia plausível a ser utilizada em ações de conservação e reconstituição de espécies ameaçadas de extinção. O objetivo do presente trabalho foi de estabelecer procedimentos de isolamento e criopreservação de espermatogônias-tronco de piracanjuba, bem como o transplante de espermatogônias-tronco em receptores estéreis, visando a geração de quimera germinativa. As espermatogônias-tronco foram isoladas utilizando a dissociação enzimática, gradiente de densidade de Percoll e o plaqueamento diferencial, sendo obtido neste processo $66 \pm 0,01\%$ de pureza. Espermatogônias-tronco oriundas das etapas de purificação foram caracterizadas quanto a expressão relativa de *ddx4*, sendo obtida maior expressão relativa, cerca de 3,5 vezes, em células oriundas do gradiente de percoll, em relação as células após plaqueamento diferencial e do tecido gonadal. Portanto, células oriundas do gradiente de percoll foram indicadas para as etapas de transplante e criopreservação *in vitro*. Experimentos de criopreservação de espermatogônias-tronco foram realizados e a melhor solução crioprotetora obtida foi o propanodiol a 1 M ($P = 1,000$). Machos adultos e juvenis diploides de *Astyanax altiparanae* foram utilizados nos experimentos de esterilização química para obtenção de receptores estéreis. Outro experimento de esterilização foi realizado utilizando juvenis triploides de *A. altiparanae* utilizando a associação da manipulação cromossômica e esterilização química. A associação das técnicas de hibridação entre espécies e manipulação cromossômica foi realizada para a obtenção dos receptores estéreis de adultos híbridos triploides (*A. altiparanae* $\times$ *A. fasciatus*). Pelos resultados obtidos nos experimentos de esterilização, os juvenis triploides e os híbridos adultos triploides foram indicados como os melhores receptores estéreis para a etapa de transplante de espermatogônias-tronco. Os machos “juvenis” triploides, tratados previamente com busulfan, foram transplantados com espermatogônias-tronco recém isoladas, enquanto que os machos híbridos adultos triploides foram transplantados com células recém isoladas e células criopreservadas. No transplante realizado em “juvenis” triploides foram visualizadas células PKH26 positivas até os 80 dias após transplante. Nos receptores híbridos adultos triploides, transplantados com células recém isoladas e criopreservadas, foram visualizadas espermatogônias se proliferando nos testículos dos receptores aos 20 dias após transplante. Os resultados obtidos de isolamento e criopreservação de espermatogônias-tronco e o posterior transplante via papila urogenital, utilizando os receptores “juvenis” triploides tratados com busulfan, e híbridos adultos triploides são inéditos, inovadores e promissores para obtenção de quimera germinativa funcional. Consequentemente, os procedimentos estabelecidos neste estudo poderão ser aplicados futuramente, em ações de conservação e reconstituição da piracanjuba, em caso de extinção.

Palavras chaves: Quimera germinativa. Manipulação cromossômica. Hibridação entre espécies. Esterilização química. Espécie ameaçada.

ABSTRACT

The piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) is an endangered species due to anthropic actions, such as riparian deforestation and the fragmentation of rivers. The association of biotechniques for the generation of in vitro genetic banks, constituted by primordial germ cells (PGCs) and germ lineage cells (spermatogonial and oogonial stem cells) with cell transplantation in sterile recipients, can be a strategy to be applied for the conservation and reconstitution of endangered species. This study aimed to establish the procedures for isolation and cryopreservation of the spermatogonia stem cells from piracanjuba, as well for the spermatogonia stem cells transplantation in sterile recipients, for the generation of germline chimera generation. Spermatogonial stem cells were isolated by enzymatic dissociation, Percoll density gradient, and differential plating, being reached a purity of $66 \pm 0.01\%$. Spermatogonial stem cells from purification steps were characterized by relative *ddx4* gene expression. A higher expression level, approximately 3.5 times, was observed in cells from the Percoll density gradient than in cells from differential plating and gonadal tissue. Therefore, cells from the Percoll density gradient were appointed for use in transplantation and *in vitro* cryopreservation procedures. The experiments of spermatogonial stem cell cryopreservation were performed and the best cryoprotectant observed was the 1 M propanediol solution ($P = 1.000$). Adult male diploid and juvenile diploid of *Astyanax altiparanae* were used in the experiments of chemical sterilization to generate sterile recipients. Another experiment was performed using juvenile triploid by the association of chromosomal manipulation and chemical sterilization. The association of hybridization between species and chromosomal manipulation was applied for the generation of triploid hybrids (*A. altiparanae* $\times$ *A. fasciatus*) as sterile recipients. In the experiments of sterilization, juvenile triploids and adult triploid hybrids were suggested as the best recipients for spermatogonial stem cells transplantation. "Juvenile" triploids treated with busulfan received transplantation of newly isolated spermatogonial stem cells, and adult triploid hybrids received transplantation of newly isolated cells and cryopreserved cells. In the transplant performed for "juvenile" triploids, PKH26-positive cells were visualized up to 80 days after transplantation. In adult triploid hybrids, both from newly isolated and cryopreserved cells, spermatogonia were visualized proliferating in the recipient's gonads 20 days after transplantation. Results from the isolation and cryopreservation of spermatogonial stem cells and the subsequent transplantation via the urogenital papilla in the sterile recipients, "juvenile" triploid and adult triploid hybrids, are unprecedented, innovative, and promissory for obtaining a functional germline chimera. Consequently, the procedures established in this study can be applied in the future in actions of conservation and reconstitution of piracanjuba in case of extinction.

Keywords: Germ chimera. Chromosomal manipulation. Hybridization between species. Chemical sterilization. Endangered species.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados no qPCR para expressão gênica das espermatogônia tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).....19

Tabela 2. Viabilidade das células tronco espermatogoniais antes do congelamento e após o descongelamento celular da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Os dados foram obtidos vindos de quatro repetições e foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa.....29

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Ilustração das etapas do processo de dissociação enzimática e isolamento das células espermatogoniais da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **1:** Exemplar de macho adulto de piracanjuba foi eutanasiado e os testículos coletados. **2:** Os testículos foram cortados em pequenos fragmentos dentro de uma cabine de fluxo laminar e submetidas ao processo de dissociação enzimática, utilizando collagenase tipo I oriunda de *Clostridium histolyticum*. **3:** Depois do processo de dissociação enzimática, as espermatogônias-tronco foram isoladas por meio de um gradiente de densidade (percoll), utilizando-se quatro gradientes (10%, 20%, 30% 40%). **4:** As bandas contendo maior número de espermatogônias-tronco (banda 20% e 30%) foram submetidas a teste de viabilidade utilizando-se o marcador de membrana, azul de tripan. **5:** Teste para verificação da atividade da fosfatase alcalina para confirmação de espermatogônia-tronco. **6:** Plaqueamento diferencial durante 14 horas como segunda etapa de purificação de espermatogônias-tronco. Após plaqueamento diferencial a avaliação da viabilidade celular (**4**) e da atividade da fosfatase alcalina (**5**) foi verificada novamente..... 16

Figura 2. Testículo de adultos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e juvenis (15 meses de idade), coletados de maio à junho e de novembro a dezembro. **A:** Testículo de juvenil em fase de desenvolvimento inicial, observando-se ninhos de espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e alguns espermatozoides. **B:** Imagem em maior aumento da área pontilhada em 2A, identificando-se nitidamente ninhos de espermatogônias, alguns espermatócitos, espermatídes e alguns espermatozoides. **C:** Testículo de macho adulto coletado em final de maio a início de junho, apresentando a espermatogênese em fase de regeneração, observando-se espermatogônias em proliferação no testículo e alguns espermatócitos, espermatídes e alguns espermatozoides isolados. **D:** Imagem em maior aumento da área pontilhada na Figura 2C para melhor identificação de espermatócitos e espermatozoides. **E:** Testículo coletado de novembro à dezembro, em fase maturo com abundantes espermatozoides no lúmen, poucas espermatogônias foram

observadas no epitélio germinativo. **F:** Imagem maior aumento da Figura 2E para identificação de espermatogônias, cisto de espermatócistos e espermatídes. Sg: espermatogônias, Sp: espermatócistos, St: espermatídes, Sz: espermatozoides, L: lúmen testicular. **Escala:** 200 µm (A, C, E)- 50 µm (B, D, F).....23

Figura 3. Espermatogônias da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) isoladas através da dissociação enzimática, seguida de gradiente de percoll. **A:** células provenientes do gradiente de percoll. **B:** células oriundas do plaqueamento diferencial. SG: espermatogônia, SP: espermatócistos, SZ: espermatozoides. **Escala:** 50 µm.....24

Figura 4. Análise da viabilidade celular das espermatogônias que foram danificadas durante o processo de dissociação enzimática e isolamento celular, usando o marcador de membrana azul de tripan, as setas brancas indicam células viáveis onde o azul de tripan não conseguiu penetrar pela membrana celular. As setas pretas indicam células inviáveis onde o azul de tripan atravessa a membrana celular. **Escala:** 50 µm.....25

Figura 5. Imagem representativa da atividade da fosfatase alcalina em espermatogônias-tronco provenientes do plaqueamento diferencial. **A:** As setas brancas com contorno preto indicam espermatogônias observadas por microscopia de luz; **B:** Contrafoto da imagem (**A**) as setas brancas apontam as espermatogônias-tronco marcadas com corante fluorescente. **Escala:** 50 µm.....25

Figura 6. Curva padrão para o gene *ddx4* (**A-B**), e sua respectiva curva de melting (**C**).....27

Figura 7. Curva padrão para o gene endogeno *β-actina* (**A-B**), e sua respectiva curva de melting (**C**).....27

Figura 8. Expressão relativa do gene *ddx4* para testículo (1); gradiente de percoll (3,623008)e plaqueamento diferencial (1,036733).....28

Figure 9. Gel de agarose a 2% na avaliação dos primers desenhados em amostra de cDNA de gônada de *Brycon orbignyanus*. **L:** Ladder 1 kb plus (Invitrogen); **1:** *B- actina*; **2:** *ddx4*.....28

Figure 10. Alinhamento da região amplificada do gene *ddx4* de *Astyanax mexicanus* e *Brycon orbignyanus*.....28

CAPITULO II

Figura 1. Esquema ilustrativo do processo para obtenção de receptores triploides através da manipulação cromossômica. **A:** Após indução hormonal os ovos de fêmeas de lambari (*Astyanax altiparanae*) foram coletados **B.** Os ovos foram fertilizados usando sêmen de lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). Dois minutos após fertilização, os ovos foram sometidos ao choque térmico. **C.** Finalmente foram obtidos animais triploides (3n). **Escala:** 1 cm.....53

Figura 2. Confirmação da triploidização mediante citometria de fluxo seguindo o protocolo de (Xavier et al., 2017) 54

Figura 3. Esquema ilustrativo do processo para obtenção de receptores híbridos triploides através da manipulação cromossômica. **A:** Após indução hormonal os ovos de fêmeas de lambari (*Astyanax altiparanae*) foram coletados **B.** Os ovos foram fertilizados usando sêmen de lambari de rabo vermelho (*Astyanax fasciatus*) para hibridação. Dois minutos após fertilização, os ovos foram submetidos ao choque térmico. **C.** Finalmente foram obtidos animais híbridos triploides. **Escala:** 1 cm.....56

Figura 4. Cronograma das etapas de aplicação de busulfan e coleta de gônada dos três experimentos realizados. No experimento 1, as aplicações de busulfan foram realizadas com intervalo de 10 dias entre cada uma delas. No experimento 2 e 3, as aplicações de busulfan foram realizadas semanalmente. Os animais coletados não recebiam a aplicação de busulfan no dia de aplicação. No experimento 4 os peixes foram mantidos até os 10 meses de idade, os animais triploides foram selecionados e as gônadas foram coletadas para confirmação de esterilidade.....58

Figura 5. Efeito do tratamento com busulfan associado a temperatura alta sobre o índice gonadossomático em machos adultos diploides de lambaris de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). Nas análises estatísticas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Os dados foram descritos como média $\pm$ erro padrão.....60

Figura 6. Imagem representativa dos aspectos visuais de coloração, redução e crescimento dos testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*), ao longo do experimento nos diferentes dias de coletas, anterior ao início, durante o tratamento e após o término do tratamento com busulfan para todos os grupos (C15, C40, B15 e B40). Os testículos dos quatro tratamentos apresentaram um aspecto translúcido durante o período de aclimação a 35°C (**A, B, C, D**). Depois de cinco aplicações de busulfan (dia 78), foi observado uma redução dos testículos nos tratamentos com busulfan B15 (**E**) e B40 (**F**), quando comparados com os grupos controle C15 (**G**) e C40 (**H**). Um mês após finalizar o experimento (dia 108), nos grupos tratados com busulfan (**K-L**), percebe-se a aparência dos testículos similar aos grupos controles (**I-J**), indicando o retorno da espermatogênese. **Escala:** 0,5 cm.....61

Figura 7. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) diploide, provenientes dos grupos controles e dos grupos tratados com busulfan, aos 28 dias do experimento. **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15, **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides. **Escala:** A-D: 100 μ m.....63

Figura 8. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides, provenientes dos grupos controles e dos grupos tratados com busulfan, aos 38 dias do experimento. **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15 e **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; Cabeça da seta: Núcleo de célula picnótica; Asterisco: Espermatozoides sendo reabsorvidos. **Escala:** A-D: 50 μ m.....64

Figura 9. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides, aos 58 dias do experimento (quarta aplicação de busulfan). **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15 e **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônia; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; Cabeça da seta: Núcleo de célula picnótica; Asterisco: Espermatozoides sendo reabsorvidos. **Escala:** A, B: 100 µm; C-D: 50 µm...66

Figura 10. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides, aos 78 dias do experimento, término do tratamento de busulfan. **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15 e **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônia; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; Cabeça da seta: Núcleo de célula picnótica; Asterisco: Espermatozoides sendo reabsorvidos. **Escala:** A, B: 100 µm; C-D: 50 µm...67

Figura 11. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides aos 108 dias do experimento, após um mês de finalizado o tratamento com busulfan. **A:** Controle C15; **B:** Controle C40; **C-D:** Grupo busulfan B15; **E-F:** Grupo busulfan B40. Sg: Espermatogônia; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; setas brancas com contorno preto: células de Sertoli. **Escala:** A-F: 50 µm....68

Figura 12. Gônadas de lambaris (*Astyanax altiparanae*) juvenis diploides, coletadas aos 28 dias do experimento, antes de iniciar o tratamento com busulfan. **A, C, D, E:** Testículos. **B:** Ovário. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; cabeça da seta: núcleo de célula picnótica; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** A-E: 200 µm.....70

Figura 13. Gônadas de lambaris (*Astyanax altiparanae*) juvenis diploides, aos 42 dias do experimento, na data da terceira aplicação de busulfan. **A:** Testículo de indivíduo do grupo controle; **B:** Ovário de indivíduo do grupo controle; **C:** Ovário de indivíduo do grupo B40. **D:** Testículo de indivíduo do grupo B50; **E:** Testículo de indivíduo do grupo B60; **F:** Ovário de indivíduo do grupo B60. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; I: interstício; cabeça da seta: núcleo de célula picnótica; Op: oócito primário; Op: oócito atresico; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** A-F: 200 µm.....71

Figura 14. Gônadas de lambaris (*Astyanax altiparanae*) juvenis diploides, aos 56 dias do experimento, depois de finalizar o tratamento com busulfan. **A:** Testículos de indivíduos do grupo controle; **B:** Ovário de indivíduo do grupo controle; **C:** Testículo de indivíduo do grupo B50; **D:** Ovário de indivíduo do grupo B60. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; I: interstício; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** A-D: 200 µm.....72

Figura 15. Análise das características morfológicas externas dos testículos de lambaris juvenis triploides, vindas do dia 28 (antes da primeira aplicação de busulfan) e dos grupos controle e tratamento com busulfan, aos 42, 49 e 79 dias do experimento. **A:** antes da primeira aplicação de busulfan; **B:** testículo de indivíduo do grupo controle aos 42 dias do experimento; **C:** testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan aos 42 dias do experimento; **D:** testículo de indivíduo do grupo controle aos 49 dias do experimento; **E:**

testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan aos 49 dias do experimento; **F**: testículo de indivíduo do grupo controle aos 79 dias do experimento; **G**: testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan aos 79 dias do experimento. **Escala**: 0.5 cm...74

Figura 16. Efeito do tratamento com busulfan em temperatura alta sobre o índice gonadosomático em machos de lambaris juvenis triploides. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão.....75

Figura 17. Testículos de lambaris juvenis triploides. **A**: Testículo de indivíduo do grupo controle aos 7 dias do experimento durante aclimação a 28°C. **B**: Testículo de indivíduo do grupo controle aos 28 dias do experimento, após a aclimação a 35°C e data da primeira aplicação de busulfan. Sg: espermatogônias; Sp: espermatócitos; St: espermátides; seta branca com contorno preto: célula de Sertoli, cabeça de seta: células com núcleo picnótico. **Escala**: A-B: 100 μ m; área contornada: 50 μ m.....77

Figura 18. Testículos de lambaris juvenis triploides, aos 42 dias do experimento, na data da terceira aplicação de busulfan. **A**: Testículo de indivíduo do grupo controle. **B**: Testículo de indivíduo tratado com busulfan; **C**: Imagem em aumento maior para identificação de células de sertoli. Sp: espermatócitos; Cp: Célula com núcleo picnótica; L: Lúmen testicular; I: Interstício; Seta branca com contorno preto: célula de Sertoli. **Escala**: A: 200 μ m; B: 100 μ m; C: 50 μ m.....78

Figura 19. Testículos de lambaris juvenis triploides aos 49 dias do experimento, após a terceira aplicação de busulfan e término do tratamento. **A**: Testículo de indivíduo do grupo controle; **B**: Testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan; **C**: Imagem em maior aumento para identificação de células de sertoli. Sp: espermatócitos; Cp: Núcleo de célula picnótica; L: Lúmen testicular; I: Interstício; Seta branca com contorno preto: célula de Sertoli. **Escala**: A-B: 200 μ m; C: 50 μ m.....79

Figura 20. Testículos de lambaris juvenis triploides coletados aos 79 dias do experimento, um mês finalizado o tratamento com busulfan. **A**: Testículo de indivíduo do grupo controle; **B-C**: Testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan. Sg: espermatogônias; Sp: espermatócitos; St: espermátides; L: Lúmen testicular; I: Interstício. **Escala**: A-C: 100 μ m.....80

Figura 21. Ovários de lambari juvenil triploide ao sétimo e vigésimo oitavo dia do experimento. **A-B**: Ovário de indivíduo no sétimo dia do experimento, na etapa de aclimação a 28°C. **C-D**: Ovário de indivíduo no vigésimo oitavo dia do experimento, no início do tratamento com busulfan a 35°C. Og: oogônia; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo; OC: Cavidade ovariana. **Escala**: A; C: 200 μ m. B; D: 50 μ m.....81

Figura 22. Ovários de lambaris juvenis triploides aos 42 dias do experimento, após duas aplicações de busulfan. **A**: Ovário de indivíduo tratada com busulfan. **B**: B: Imagem em maior aumento vinda de **A**. Og: oogônias; Op: oócitos primários; Tc: tecido conjuntivo; OC: cavidade ovariana; Vs: vaso sanguíneo. **Escala**: A: 200 μ m; B: 50 μ m.....82

Figura 23. Ovário de lambaris juvenis triploides aos 49 dias do experimento, após a terceira aplicação de busulfan e término do tratamento. **A:** Ovário de indivíduo tratado com busulfan. **B:** Imagem em maior aumento de **A**. Og: oogônia; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** **A:** 100 µm; **B:** 50 µm.....82

Figura 24. Testículo de híbrido adulto triploide aos 10 meses de idade. **A:** Visualização macroscópica. **B:** Visualização de lúmen testicular. **C:** Imagem em maior aumento da região caudal. **D:** Imagem em maior aumento da região central. L: Lúmen testicular; I: Interstício. **Escala:** **A:** 1 cm; **B:** 400 µm; **C-D:** 100 µm.....83

Figura 25. Ovário de híbrido adulto triploide aos 10 meses de idade. Observando-se oogônias (Og), oócitos (Oc); células foliculares (Cf) e vasos sanguíneos (Vs). **Escala:** 50 µm.....84

CAPITULO III

Figura 1. Testículo de lambari “juvenil” triploide, após o tratamento com busulfan. Controle experimental das características morfológicas do testículo no momento da realização do transplante. **A:** Testículo do indivíduo visualizado em menor aumento, confirmando a depleção completa da espermatogênese pelo tratamento com busulfan, **B:** Visualização em maior aumento de região da Figura A, sendo identificado a presença de células de Sertoli. L: Lúmen testicular; I: Interstício; CS: Célula de sertoli. **Escala:** **A:** 400 µm; **B:** 50 µm.....101

Figura 2. Testículos de “juvenis” triploides analisadas por microscopia de fluorescência e óptica, aos 23 dias após o transplante. **A; E:** Linhas ponteadas em branco indicam regiões contendo espermatogônias marcadas com PKH26, visualizadas por microscopia de fluorescência. **B:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **A**, sendo a lâmina corada com hematoxilina e eosina. **C-D:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **A** em maior aumento, identificando as espermatogônias. **F:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **E**, sendo a lâmina corada com hematoxilina e eosina. As linhas ponteadas em preto indicam as regiões onde foram identificadas as espermatogônias marcadas com PKH26. **Escala:** **A, B:** 200 µm; **F:** 100 µm; **C, D, E:** 50 µm.....102

Figura 3. Testículo de “juvenil” triploide analisada por microscopia de fluorescência e óptica, aos 42 dias após transplante. **A:** Linhas ponteadas em branco indicam regiões contendo células germinativas PKH26 positivas, visualizadas por microscopia de fluorescência. **B:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **A**, sendo a lâmina corada com hematoxilina e eosina, evidenciando as células germinativas. Linhas ponteadas em preto indica as regiões onde foram identificados espermatogônias e espermátocitos PKH26 positivos. **Escala:** **A-B:** 50 µm.....103

Figura 4. Testículo de “juvenil” triploide analisada por microscopia de fluorescência e óptica, aos 80 dias após transplante. **A:** Análise por microscopia de fluorescência, onde as linhas ponteadas em branco indicam regiões de espermatogônias marcadas com

PKH26. **B:** Análise por microscopia óptica, com lâmina corada com hematoxilina e eosina, das regiões delimitadas em **A**. Linhas ponteadas em preto indicam as regiões onde foram identificados as espermatogônias e espermátocitos PKH26 positivos, em **A**. **Escala:** A-B: 50 µm.....103

Figura 5. Testículo de híbridos adultos triploides analisada por microscopia de fluorescência, aos 10 dias após o transplante. **A:** Análise por microscopia de fluorescência, onde as linhas ponteadas em branco indicam regiões de espermatogônias marcadas com PKH26. **B:** Linhas ponteadas indicam a região em **A** onde foram identificadas células PKH26 positivas. **Escala:** A-B:100 µm.....104

Figura 6. Testículo de híbridos adultos triploides analisada por microscopia óptica, aos 10 dias após transplante. **A:** Testículo do grupo controle desprovido de células germinativas, com presença do lúmen testicular (L) e interstício (I). **B:** Testículo transplantado, as setas indicando células do epitélio germinativo (Ep) e macrófagos (Mc). **Escala:** A: 200 µm; B: 50 µm.....105

Figura 7. Testículo de híbridos adultos triploides analisada por microscopia óptica, aos 20 dias após transplante, sendo as lâminas coradas com hematoxilina e eosina. **A:** Testículo do grupo controle sendo observado apenas lúmen testicular e interstício. **B:** Testículo representativo dos transplantes de espermatogônias recém isoladas, com as setas indicando espermatogônias-tronco em processo de proliferação **C:** Testículo de receptor transplantado com células criopreservadas, observando a proliferação e colonização do testículo. **D:** Imagem em maior aumento da região de **C**, sendo identificado espermatogônias e espermátocitos no testículo receptor. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermátocitos; I: Interstício; L: Lúmen testicular. **Escala:** A-C: 200 µm; B-D: 50 µm.....105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Criopreservação de células germinativas.....	3
1.2 Transplante de células germinativas.....	4
1.3 Lambari de rabo amarelo (<i>Astyanax altiparanae</i>) como receptor de células germinativas.....	7
Capítulo I - Caracterização, isolamento e criopreservação de espermatogônias-tronco da piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i>	
RESUMO.....	10
1. OBJETIVOS.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Coleta de animais.....	12
2.2. Análise histológica do testículo de piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>).....	12
2.3. Isolamento de espermatogônias-tronco.....	13
2.4. Caracterização das células tronco espermatogônias isoladas.....	16
2.4.1. Desenho dos primers para o gene de interesse e endógeno.....	17
2.4.2. Síntese de cDNA, análise dos primers e confirmação das sequências.....	17
2.4.3. Expressão gênica relativa de <i>ddx4</i> nas amostras provenientes da etapa de purificação de espermatogônias-tronco.....	18
2.5. Criopreservação de células espermatogoniais.....	19
2.5.1 Viabilidade e concentração de espermatogônias-tronco purificadas.....	19
2.5.2. Criopreservação de espermatogônias-tronco.....	20
2.5.3. Análise estatística.....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1. Caracterização histológica do testículo de piracanjuba.....	22
3.2. Isolamento de espermatogônias-tronco.....	24
3.3. Expressão gênica relativa de <i>ddx4</i>	26
3.4. Confirmação das sequências dos genes de piracanjuba.....	26
3.5 Viabilidade das espermatogônias-tronco após criopreservação.....	28
4. DISCUSSÃO.....	29

5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS.....	36
 Capítulo II. Esterilização de lambari <i>Astyanax altiparanae</i> com ênfase especial para ser receptor de células germinativas de piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i>	
RESUMO.....	47
1. OBJETIVOS.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Experimento 1: Esterilização de lambaris adultos diploides.....	49
2.2 Experimento 2: Esterilização de lambaris juvenis diploides.....	50
2.3 Experimento 3: Esterilização de lambaris juvenis triploides.....	51
2.3.1 Produção de lambaris triploides através da manipulação cromossômica.....	52
2.3.2 Confirmação da triploidização.....	53
2.3.3 Depleção da gametogênese em lambaris juvenis triploides.....	54
2.4 Experimento 4: Produção de híbridos triploides (<i>Astyanax altiparanae</i> × <i>Astyanax fasciatus</i>).....	55
2.5 Confirmação da depleção da gametogênese por histologia convencional.....	56
3. RESULTADOS.....	59
3.1 Experimento 1: Depleção da espermatogênese em lambaris diploides adultos..	59
3.1.1. Análise de GSI e características morfológicas externas dos testículos.....	59
3.1.2. Efeitos do busulfan e da alta temperatura nos testículos.....	62
3.2. Experimento 2: Depleção da gametogênese em lambaris juvenis diploides.....	69
3.3. Experimento 3: Depleção da gametogênese em lambaris juvenis triploides.....	73
3.3.1. Análise de GSI e características morfológicas externas dos testículos.....	73
3.3.2. Análises das características morfológicas dos testículos através de histologia convencional.....	75
3.3.3. Análises das características morfológicas dos ovários através de histologia convencional.....	80
3.4 Experimento 4: Estrutura da gônada dos híbridos adultos triploides.....	83
4. DISCUSSÃO.....	84
5. CONCLUSÃO.....	89
6. REFERÊNCIAS.....	90

Capítulo III. Transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) utilizando como receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (*Astyanax altiparanae*) e híbridos adultos triploides (*A. altiparanae* X *A. fasciatus*)

RESUMO.....	94
1. OBJETIVOS.....	95
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	96
2.1 Receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (<i>Astyanax altiparanae</i>) e machos de lambaris adultos híbridos triploides (<i>Astyanax altiparanae</i> × <i>Astyanax fasciatus</i>).....	96
2.2 Isolamento de espermatogônia-tronco de piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> pelos métodos de dissociação enzimática e gradiente de percoll.....	96
2.3 Criopreservação de espermatogônias-tronco.....	97
2.4 Marcação de espermatogônia-tronco com o marcador de membrana fluorescente PKH26.....	98
2.5 Transplante em receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (<i>A. altiparanae</i>) tratados previamente com busulfan.....	98
2.6 Transplante em receptores machos de lambaris híbridos adultos triploides (<i>Astyanax altiparanae</i> × <i>Astyanax fasciatus</i>).....	99
2.7 Avaliação de quimerismo por histoquímica.....	99
3. RESULTADOS.....	100
3.1 Transplante de espermatogônia-tronco em lambari triploide tratado previamente com busulfan.....	100
3.2 Transplante de espermatogônia-tronco para machos de híbridos adultos triploides.....	104
4. DISCUSSÃO.....	106
5. CONCLUSÃO.....	111
6. REFERÊNCIAS.....	112
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	116

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Brycon*, da família Characidae e subfamília Bryconinae, é um dos principais gêneros de peixes da região Neotropical, sendo as espécies conhecidas como grandes migradores (CAVALCANTI, 1998; HOWES, 1982; LIMA, 2003). A espécie *Brycon orbignyanus*, popularmente conhecida como piracanjuba, é uma espécie com potencial nutricional, sendo muito apreciada pelos consumidores e utilizada na pesca esportiva (BORBA M.R., FRACALOSSO D.M., 2006). Porém, as populações silvestres da piracanjuba vêm apresentando um declínio de aproximadamente 97% da extensão original, sendo afetada principalmente por desmatamento ciliar e pela fragmentação dos rios causada pelas hidroelétricas (AGOSTINHO, Â. A., THOMAZ, S. M., & GOMES, 2005).

As ações antrópicas têm contribuído para que a piracanjuba seja classificada na categoria de em perigo (EN) A2c desde 2013, na lista de espécies ameaçadas de extinção do Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção no Brasil (BIODIVERSIDADE, 2018). Os animais classificados em perigo (EN) A2c apresentam as seguintes condições de riscos de extinção; redução da população observada, estimada, inferida ou suspeitada de ter ocorrido no passado, sendo que as causas da redução podem não ter cessado ou não ser compreendidas ou não ser reversíveis; apresentando também um declínio na área de ocupação, extensão de ocorrência e/ou qualidade do habitat.

Portanto, ações conservacionistas direcionadas as populações naturais desta espécie, tais como a reprodução em cativeiro e repovoamento dos rios, têm sido implementadas (LOPERA-BARRERO, 2007). No entanto, as atividades de repovoamento, sem procedimentos técnicos necessários tal como análises de genética de populações, podem impactar a população natural, trazendo outros problemas, como a redução da variabilidade genética e o desvio na proporção sexual em peixes nascidos em

cativeiro. No caso da piracanjuba, tem sido observado que a maioria dos descendentes de reprodução em cativeiro são machos. A baixa variabilidade genética e o desvio da proporção sexual podem comprometer a eficácia dos programas de repovoamento (LOPERA-BARRERO, 2007; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2010; ZARDO et al., 2021).

Além da reprodução em cativeiro e seu uso para reforço de estoque em ambiente natural, outras ações têm sido empregadas na conservação das espécies. Uma das abordagens mais promissoras para a conservação é a constituição de bancos genéticos, através da criopreservação de células das linhagens germinativas, sendo as células germinativas primordiais (PGC) e espermatogônias e oogônias-tronco. A conservação *in vitro* de tais células, permite sua posterior utilização na reconstituição de espécies, através do transplante destas células para receptores estéreis, visando a geração de quimeras germinativas. Portanto, o uso de ferramentas biotecnológicas torna-se importante na consolidação de técnicas de bancos genéticos *in vivo* e *in vitro*, com protocolos efetivos não apenas de armazenamento, mas também de reconstituição no caso de níveis mais críticos de ameaça. Nesse contexto, a constituição de um banco genético por meio da preservação de células germinativas e subsequente reconstituição através de propagação mediada (xenogênese), seria uma estratégia sólida para conservar e reconstituir peixes ameaçados de extinção, preservando inclusive os componentes genéticos importantes, como plasma germinativo e DNA mitocondrial, sendo possível realizar a transferência da informação genética para as gerações futuras (CINALLI R.M., RANGAN P., 2008; REUNOV et al., 2000).

A geração de quimeras germinativas envolve várias etapas, tais como a criopreservação de células germinativas isoladas, a geração dos receptores estéreis e o transplante destas células em receptores estéreis, os quais são apresentados a seguir.

1.1 Criopreservação de células germinativas

A necessidade de conservar recursos genéticos de espécies de peixes ameaçados de extinção conduz ao desenvolvimento de protocolos para criopreservação de gametas e de suas células precursoras. Os espermatozoides por terem características específicas, como tamanho reduzido e resistência ao resfriamento, relativamente alta, apresentam algumas vantagens em comparação a outros tipos celulares (VIVEIROS et al., 2012). No entanto, para espécies em risco de extinção, a posterior reconstituição usando sêmen criopreservado não permite conservar material genético de origem materna como plasma germinativo e DNA mitocondrial. Além do mais, a técnica de androgênese empregada na reconstituição de espécies, que utiliza o sêmen, apresenta baixa taxa de sobrevivência dos descendentes (YASUI, G.S., T. FUJIMOTO, 2010). Deste modo, protocolos para a criopreservação de células germinativas (PGCs, espermatogônias e oogônias-tronco) foram desenvolvidos com dois objetivos principais: 1) conservar a informação genética em alta qualidade, gerando bancos genéticos *in vitro*; 2) regenerar novos indivíduos através do transplante de células, utilizando receptor estéril, contribuindo deste modo, a minimizar potencialmente a extinção de espécies (HAGEDORN et al., 2018).

A constituição de banco genético *in vitro*, a partir de células germinativas-tronco, permite preservar o material genético, como plasma germinativo, DNA mitocondrial e centrôssomos, sendo importante na manutenção da variabilidade genética de uma população. Esse tipo de banco genético vem sendo estabelecido em algumas espécies de salmonídeos (*Oncorhynchus mykiss*) (OKUTSU et al., 2006), esturjão (*Acipenser ruthenus* e *Tinca tinca*) (GOLPOUR et al., 2016; LINHARTOVÁ et al., 2014) e organismos modelos como medaka (*Oryzias latipes*) (SEKI et al., 2017) e zebrafish (*Danio rerio*) (SAITO et al., 2011).

1.2 Transplante de células germinativas

O transplante de células germinativas em peixes foi desenvolvida inicialmente como uma estratégia para reconstituir espécies em perigo de extinção, sem embargo este método de reconstituição tornou-se interessante para aumentar a produção de animais de interesse comercial (GOTO; SAITO, 2019; TAKEUCHI et al., 2018). A técnica de quimerismo ou transplante de células germinativas possibilita que células de um peixe doador sejam transplantadas para um peixe receptor estéril ou infértil, o qual irá produzir somente gametas com características genéticas do peixe doador (OKUTSU et al., 2007; TAKEUCHI et al., 2009; YOSHIZAKI et al., 2010). Isto pode ser realizado através do isolamento de células da linhagem germinativa (PGCs e espermatogônias ou oogônias-tronco); as quais têm capacidade de se proliferar e apresentam alta plasticidade sexual, ou seja, são capazes de se diferenciar em gametas de ambos sexos, dependendo do ambiente somático no qual se desenvolvem (LACERDA; COSTA; DE FRANÇA, 2014; NÓBREGA et al., 2010; OKUTSU et al., 2007). Além disso, estas células permitem conservar e transmitir a informação genética para a geração seguinte, tanto pela herança citoplasmática como nuclear, sendo importantes para manter a variabilidade genética de uma população (YASUI, G.S., T. FUJIMOTO, 2010).

O transplante de células germinativas pode ser realizado utilizando-se diferentes tipos de células do doador, bem como receptores em diferentes fases do desenvolvimento, podendo ser realizado o transplante celular utilizando células oriundas de blastômeros e transplantadas para outro embrião em blástula ou gástrula inicial (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2001). Assim como, PGCs vindas de embriões doadores e transplantadas para outros embriões receptores (SAITO et al., 2008) ou ainda, para larvas recém-eclodidas (TAKEUCHI, 2003). Espermatogônias-tronco ou oogônias-tronco provenientes de gônadas de adultos podem ser transplantadas para larvas (TAKEUCHI

et al., 2009; WONG et al., 2011) ou gônadas de receptores adultos (MAJHI et al., 2014; SILVA et al., 2016). A combinação de transplante de células germinativas de doadores para receptores mencionados são distintas e empregam linhagens celulares diferentes e receptores em fases diferentes. Por isso, existe a necessidade de ser constituídos bancos genéticos *in vitro* que permitam congelar os diferentes tipos de linhagens celulares até que estas células possam ser transplantadas para algum receptor estéril. A criopreservação de tais células apresenta a vantagem de realizar o transplante na fase de desenvolvimento desejado do receptor, enquanto que no transplante de células recém isoladas é necessário a sincronização das etapas de coletas e da fase de desenvolvimento do receptor, sendo esta sincronização muitas vezes de difícil obtenção.

Dentre as tecnologias de reconstituição de espécies em risco de extinção, o transplante de células germinativas-tronco (espermatogônias e oogônias) em receptores adultos oferece muitas vantagens. Uma delas, seria o transplante empregando técnicas mais simples de serem executadas e não tão elaboradas, como o transplante via papila urogenital. Este procedimento permite a obtenção de gametas da espécie doadora em um período de tempo mais curto e sem a necessidade de usar equipamentos altamente sofisticados para realização do transplante; além de que, o manejo de peixes adultos é mais fácil quando comparado com o de embriões e larvas (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2019; LACERDA et al., 2013).

Independentemente da fase em que será realizado o transplante de células germinativa, os animais selecionados como receptores devem ter as seguintes características como compatibilidade fisiológica, imunológica, crescimento rápido, ciclo reprodutivo curto e fácil manejo em cativeiro (MAJHI et al., 2019; S.M.S.N. LACERDA, S.R. BATLOUNI, S.B.G. SILVA, C.S.P. HOMEM, 2006; YOSHINAGA et al., 2021). Entretanto, a característica principal de um receptor é ter uma gônada livre de células

germinativas endógenas ou seja estéril, que permita a entrada das células doadoras na gônada do receptor, para que posteriormente estas células exógenas possam proliferar e colonizar a gônada receptora (BRINSTER et al., 2003; MAJHI et al., 2009; S.M.S.N. LACERDA, S.R. BATLOUNI, S.B.G. SILVA, C.S.P. HOMEM, 2006).

Portanto, diversas estratégias de esterilização como o uso de temperaturas altas têm mostrado ser eficaz na depleção de células germinativas (NOZU; NAKAMURA, 2020; PANDIT et al., 2015), porém esta esterilização não sempre é permanente (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015; ITO et al., 2008). Como alternativa, pode ser utilizado o tratamento químico, como o busulfan, associado à altas temperaturas, sendo efetivo para a depleção completa das células germinativas endógenas de peixes adultos em curtos períodos de tempo (LACERDA et al., 2010; MAJHI et al., 2009, 2014), porém o uso em receptores diploides tem demonstrado que a gametogênese é sempre reversível. Tentando contornar este problema, o aumento do número da administração e da dosagem do agente químico busulfan, associado a temperaturas altas, foram realizados em espécies como a carpa *Cyprinus carpio* e o bagre *Pangasianodon hypophthalmus*, conseguindo obter a esterilização completa (MAJHI et al., 2017, 2019).

A hibridização de espécies é um método utilizado para obter animais estéreis (PONJARAT et al., 2019; YOSHIKAWA et al., 2018), porém não todos os híbridos sempre são estéreis, podendo ocasionar um impacto negativo na ictiofauna nativa em caso de escape ao ambiente natural (FUJIMOTO et al., 2008). A manipulação cromossômica é uma outra metodologia utilizada para obtenção de peixes triploides estéreis ou inférteis (BAR et al., 2016; BERTOLINI et al., 2020; DO NASCIMENTO et al., 2017), os quais podem ser utilizados como receptores de células germinativas seja na fase de embrião ou larva (TAKEUCHI; YOSHIKAWA; TAKEUCHI, 2001; WONG et al., 2011). No entanto, para o transplante em receptores adultos, tem sido observado em nossos estudos que esta

técnica parece não ser efetiva, visto que os receptores possuem em suas gônadas células germinativas endogênas, o qual impossibilita a entrada das células transplantadas na gônada comprometendo o sucesso do transplante. Desta forma foi realizado um trabalho em nosso laboratório para esterilização completa associando a hibridização e a manipulação crossômica, no qual obteve-se machos completamente estéreis (PIVA et al., 2018). Visando a esterilização completa em fêmeas foi associada a manipulação cromossômica com o tratamento químico e altas temperaturas, podendo ser uma alternativa para o uso de receptores triploides no transplante de células germinativas em adultos.

1.3 Lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) como receptor de células germinativas

O lambari (*Astyanax altiparanae*) é uma espécie nativa de pequeno porte, sendo apreciada para consumo humano e utilizado como isca viva na pesca esportiva (GARUTTI, 2003; PORTO-FORESTI et al., 2005). Por apresentar características como, hábito alimentar onívoro, crescimento rápido, maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade e fácil manejo em cativeiro (PORTO-FORESTI et al., 2001), esta espécie tem sido utilizada como modelo animal em diferentes áreas de pesquisa. O Laboratório de Biotecnologia do ICMBio/CEPTA, vem utilizando, a cerca de 10 anos, o lambari como modelo animal, sendo realizados vários trabalhos de pesquisa, tais como manipulação cromossômica (ADAMOV et al., 2017), híbridos estéreis (PIVA et al., 2018), transplante de PGCs (COELHO et al., 2019), avaliação de toxicidade de herbicidas e toxinas (ROCHA, 2019), dentre outros. Neste trabalho, o lambari foi utilizado com a finalidade de estabelecer um protocolo de esterilização completa e posteriormente ser utilizado como receptor de células germinativas.

Vários trabalhos realizados no Laboratório de Biotecnologia de Peixes foram utilizados como base para o estudo do lambari como receptor, dentre eles podemos citar o estabelecimento do protocolo de reprodução *in vitro* (YASUI et al., 2014), o qual proporcionou a realização de vários outros trabalhos, tais como o desenvolvimento embrionário (SANTOS, 2014), larvicultura (BERTOLINI et al., 2018) e manipulação cromossômica, para triploidização (ADAMOV et al., 2017) e tetraploidização (DO NASCIMENTO et al., 2020). Assim como em trabalhos visando o estabelecimento de protocolos para reconstituir espécies ou gerar populações monossexuais através da ginogênese (NASCIMENTO et al., 2020) e androgênese (PEREIRA-SANTOS, 2017).

Dentre os estudos citados, o mais importante para este trabalho foi o de manipulação cromossômica para geração de animais triploides estéreis. Neste trabalho foi observado que o lambari triploide ainda apresentava, tanto em fêmeas como em machos, células germinativas endógenas, as quais impedem a colonização da gônada pelas células transplantadas. Desta forma, outros trabalhos foram realizados na busca da obtenção de um receptor ideal, utilizando a combinação da hibridação e manipulação cromossômica, visando obter animais 100% estéril. Neste trabalho, o melhor resultado foi a obtenção de machos estéreis, porém as fêmeas ainda apresentavam a formação de oogônias no ovário (PIVA et al., 2018).

Visando obter a esterilização completa e gônadas bem desenvolvidas para o transplante de células germinativas tronco em receptores adultos, o presente trabalho envolveu a produção de lambaris triploides pela manipulação cromossômica, associado a esterilização química, através do uso de busulfan em altas temperaturas, etapa anterior ao transplante. As gônadas dos lambaris triploides gerados pela manipulação cromossômica ainda apresentam células germinativas, as quais ocupam o espaço das gônadas, dificultando a entrada das células transplantadas nos nichos de proliferação destas células.

Para a depleção das células germinativas endógenas foi utilizado o tratamento químico de esterilização, uma vez que o busulfan administrado em altas temperaturas, promove a eliminação parcial ou total destas células germinativas (S.M.S.N. LACERDA, S.R. BATLOUNI, S.B.G. SILVA, C.S.P. HOMEM, 2006), propiciando a entrada das células transplantadas no interior das gônadas.

A estratégia de associar estes métodos pode aumentar a eficiência da geração de quimeras germinativas. O estabelecimento de protocolo de esterilidade em adultos de lambari, permitirá a utilização desta espécie como receptora de células germinativas tronco, podendo ser realizado o transplante de células através da papila urogenital. O estabelecimento deste processo auxiliará na reconstituição de espécies ameaçadas de extinção. Visando facilitar o entendimento das etapas desenvolvidas, bem como torná-lo mais instrutivo, o presente trabalho é apresentado em três capítulos. O primeiro capítulo diz respeito à caracterização, isolamento e criopreservação *in vitro* de espermatogônia-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). O segundo capítulo trata da esterilização química utilizando o lambari (*Astyanax altiparanae*) como modelo de receptor, realizando-se o tratamento de esterilização em machos adultos diploides, animais juvenis diploides e juvenis triploides obtidos através da manipulação cromossômica. O terceiro capítulo trata do transplante de espermatogônias-tronco de piracajuba (*B. orbignyanus*), utilizando como receptores híbridos adultos triploides (*A. altiparanae* × *Astyanax fasciatus*) e lambaris juvenis triploides tratados previamente com busulfan.

Capítulo I - Caracterização, isolamento e criopreservação de espermatogônias-tronco da piracanjuba *Brycon orbignyanus*

RESUMO

As espermatogônias-tronco de machos adultos de piracanjuba foram obtidas através do processo de dissociação enzimática dos testículos e isoladas mediante gradiente de densidade e plaqueamento diferencial. As espermatogônias-tronco provenientes destas etapas de purificação foram avaliadas através de expressão gênica do *ddx4*, também conhecido como *vasa*, por meio da atividade da fosfatase alcalina e análises histológicas. A criopreservação das espermatogônias-tronco foi realizada testando cinco crioprotetores (etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida e propanodiol), em três molaridades diferentes (1 M, 1,5 M e 2 M). As bandas oriundas do gradiente de percoll (20% e 30% de percoll) que apresentavam as maiores concentrações de espermatogônias-tronco, foram misturadas, sendo obtido $58,35 \pm 0,03\%$ de pureza de células espermatogônias. A pureza das células espermatogônias aumentou para $66,00 \pm 0,01\%$ depois de serem submetidas ao plaqueamento diferencial. Os resultados da expressão gênica relativa do *ddx4* foi cerca de 3,5 vezes maior em células vindas do gradiente de percoll, em relação a gônada e das células após plaqueamento diferencial. As espermatogônias-tronco oriundas das duas etapas de purificação apresentaram alta atividade da fosfatase alcalina em relação aos outros tipos celulares e as análises microscópicas evidenciaram que estas células positivas para fosfatase alcalina apresentavam características morfológicas típicas de espermatogônias-tronco. No teste dos crioprotetores, o propanodiol 1 M foi o melhor crioprotetor após descongelamento ($P = 1,000$) em relação aos outros crioprotetores avaliados. Apesar do plaqueamento diferencial apresentar maior pureza de espermatogônia tronco, foi observado que neste processo ocorre queda da expressão de *ddx4*, sugerindo que este processo pode alterar as características destas células, e portanto, células oriundas do gradiente de percoll podem ser as mais indicadas para o transplante e criopreservação.

1. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Estabelecer condições ideais para o isolamento e criopreservação de espermatogônias-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), de modo a manter as características intrínsecas destas células para o uso em transplante, visando a constituição de bancos genéticos *in vitro*.

Objetivos específicos

- Identificar a melhor época para realizar isolamento de espermatogônias-tronco de animais adultos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).
- Purificar espermatogônias-tronco de gônadas de animais adultos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).
- Avaliar a purificação das espermatogônias-tronco por métodos expressão gênica e pela atividade da fosfatase alcalina.
- Obter solução crioprotetora ideal para a criopreservação de espermatogônias-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).
- Criopreservar espermatogônias-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de animais

A coleta dos animais e os experimentos foram realizados no Centro de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA), Pirassununga - SP, Brasil, aprovado previamente pelo Comitê de Ética do CEPTA (CEUA N° 02031.000088/2021-61).

2.2. Análise histológica do testículo de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

Para identificar a melhor época do ano e a melhor fase da espermatogênese para realizar o isolamento de espermatogônias-tronco da piracanjuba, foram coletadas gônadas de machos juvenis de 15 meses de idade (n= 2), machos sexualmente maduros com 8 anos de idade coletados durante a estação reprodutiva, de novembro a fevereiro (n= 2) e durante o inverno, no final de maio e início de junho (n= 2). As gônadas coletadas foram fixadas em bouin por 24 horas e depois mantidas em etanol a 70%. Posteriormente, o material foi processado por técnica de histologia convencional, sendo realizada a desidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clareadas em xilol e incluídas em paraplast® (Sigma # SLBS8607, St. Louis, USA). Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo equipado com lâmina de aço (Leica RM2235, Lincolnshire, USA), com 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, analisadas por microscopia (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e fotografadas (Nikon DSRi2, Nikon, Tóquio, Japão). As análises de desenvolvimento gonadal em que se encontravam os indivíduos foram avaliadas com base em estudos prévios (BROWN-PETERSON et al., 2011).

2.3. Isolamento de espermatogônias-tronco

Foi utilizado um exemplar macho de piracanjuba (*B. orbignyanus*) com 1,345 kg de peso corporal e comprimento padrão de 44 cm. O animal foi eutanasiado utilizando uma solução de eugenol a 200 mg/L. O testículo foi coletado, com peso de aproximadamente 1 g, um fragmento foi armazenado à -80°C para posterior análise de expressão gênica. O restante do testículo foi utilizado para o isolamento de espermatogônias-tronco por meio de dissociação enzimática e gradiente de densidade de percoll.

Para realizar o processo de isolamento de espermatogônias-tronco, o testículo coletado foi transferido para uma placa de Petri estéril de 90 x 15 mm, contendo meio de cultivo celular Leibovitz (gibco #21083027, Grand Island, USA), suplementado com 0,5% soro fetal bovino, 2 mM de glutamina (Sigma #G7513, St. Louis, USA), 1 mM de piruvato (Sigma #S8636, St. Louis, USA), 1X de solução de MEM vitaminas (Sigma #M6895 St. Louis, USA), 1X de solução de MEM aminoácidos não essenciais (Sigma #M7147, St. Louis, USA) e 1X de solução de antibiótico e antimicótico (Sigma #A5955, St. Louis, USA). Em uma cabine de fluxo laminar (FUH12, VECO, Campinas - SP, Brasil), o testículo foi triturado utilizando lâminas de bisturi e lavado três vezes com meio Leibovitz (L-15) suplementado, afim de retirar o excesso de células sanguíneas.

O tecido testicular triturado foi transferido para tubos de centrífuga de 15 mL, adicionando cerca de 0,5 g de tecido por tubo contendo 2 mg/mL de collagenase tipo I oriunda de *Clostridium histolyticum* (Sigma #C0130, St. Louis, USA), em um total de 10 mL do meio L-15 suplementado. As amostras foram incubadas em agitador (Agitador PROENIX, São Paulo, Brazil) por 2 horas em temperatura ambiente. Após este período de incubação, 20 µg de DNase I (Sigma-Aldrich #SLBT5559, St. Louis, USA) foram adicionados para cada mL de solução e incubado por mais uma hora no agitador.

A suspensão celular foi filtrada em malha de nylon de 50 µm de diâmetro de poro para a retirada de tecidos não degradados. A suspensão celular foi transferida para tubo de centrífuga de 15 mL, adicionado meio L-15 suplementado para atingir o volume final de 10 mL e centrifugado a 300 x g por 5 minutos a 25°C (Eppendorf 5702, Hamburg, Germany). O pellet celular foi suspenso em 10 mL de meio L-15 suplementado e centrifugado a 300 x g por 5 minutos, sendo realizadas duas lavagens. Esta etapa teve como finalidade a retirada de collagenase e DNase residuais e inativação da collagenase. As espermatogônias-tronco foram fracionadas de outras células testiculares (espermátides, espermatócitos, células somáticas e espermatozoides) por gradiente de densidade usando concentrações de 10, 20, 30 e 40% de Percoll® Plus (Sigma-Aldrich # SLBH8181V, St. Louis, EUA). Para tal, as soluções do gradiente de percoll foram colocadas no tubo de centrífuga de 15 mL vindos da maior concentração para a menor concentração de percoll. A suspensão celular foi cuidadosamente depositada na superfície da solução de 10% de percoll no gradiente de densidade e centrifugada a 800 x g durante 30 minutos a 25°C.

As bandas coletadas foram ressuspensas em 10 mL de meio L-15 suplementado e centrifugada a 300 x g por 8 minutos a 25°C para remoção de Percoll. Em seguida, as células depositadas nos fundos dos tubos de centrífuga foram suspensas em 1 mL de meio L-15 suplementado. As suspensões celulares foram analisadas por microscopia para avaliar a fração contendo o maior percentual de células tronco espermatogoniais. As duas bandas (20% e 30% de percoll) contendo maior número de espermatogônias-tronco foram reunidas e ressuspensas em 5 mL de solução de D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco #31053028, Grand Island, USA) e centrifugada a 300 g x 5 minutos por duas vezes, com a finalidade de retirar o soro fetal bovino da solução anterior, visto que a atividade do soro fetal bovino inibe a marcação das células tronco com fosfatase

alcalina. Seguidamente, o pellet celular foi ressuspensionado em 500 µL de D-MEM contendo 1 µL de substrato da fosfatase alcalina (Life Technologies #A14353, Frederick, USA). Esta enzima tem sido considerada um marcador de células pluripotentes e de células germinativas embrionárias (ENGLUND; SARTIPY; HYLLNER, 2011; O'CONNOR et al., 2008). A marcação das células foi verificada através de microscopia de fluorescência (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e fotografadas (Nikon DSRi2, Nikon, Tóquio, Japão). Depois de confirmada a presença de espermatogônia-tronco, 10 µL de suspensão celular foi utilizada para quantificação da concentração celular através de uma câmara de Neubauer e sua viabilidade foi verificada em triplicata, utilizando-se 30 µL de suspensão celular acrescida de 5 µL de azul de tripan a 0,4% (Gibco #15250061, Grand Island, USA).

A suspensão celular oriunda do gradiente de percoll foi submetida ao plaqueamento diferencial, usando Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM de alta glicose) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina (Sigma # G7513, St. Louis, EUA), 1 mM de piruvato (Sigma # S8636, St. Louis, EUA) 1X de solução de MEM vitaminas (Sigma # M6895 St. Louis, EUA), 1X de solução de MEM aminoácidos não essenciais (Sigma # M7147, St. Louis, EUA) e 1X de solução antibiótica e antimicótica (Sigma # A5955, St. Louis, EUA). A placa foi incubada por 14 h em incubadora com 5% de CO₂ a 30°C de temperatura e atmosfera com 100% de umidade. Após este período, as células em suspensão foram coletadas, centrifugadas a 300 x g por 8 minutos a 25°C, e ressuspensionadas em meio L-15 suplementado. Estas etapas estão ilustradas na Figura 1.

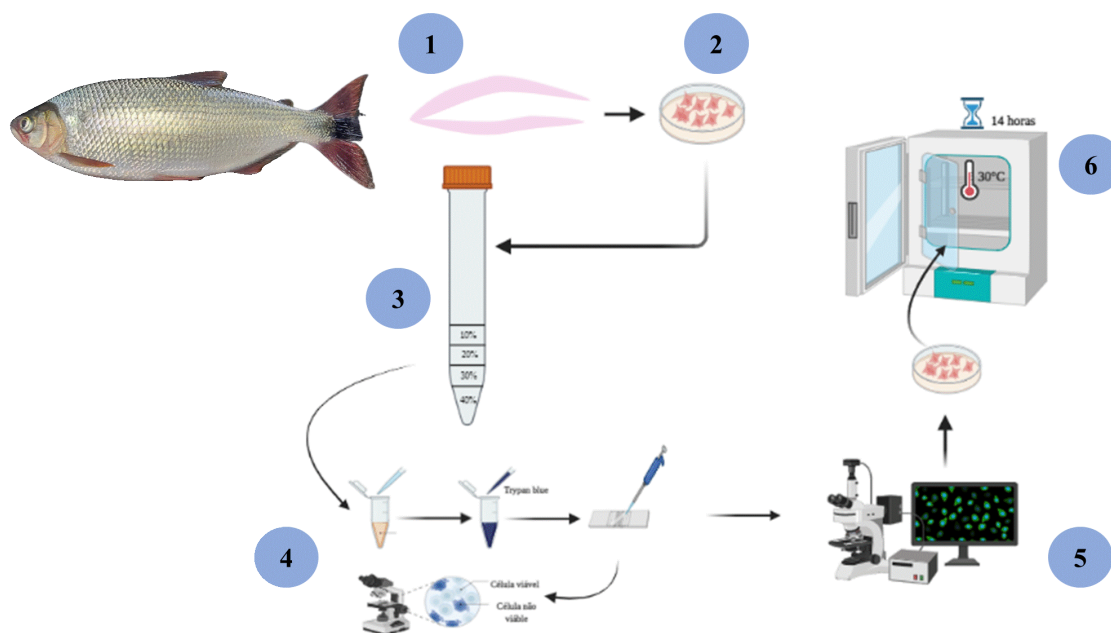


Figura 1. Ilustração das etapas do processo de dissociação enzimática e isolamento das células espermatogoniais da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **1:** Exemplar de macho adulto de piracanjuba foi eutanasiado e os testículos coletados. **2:** Os testículos foram cortados em pequenos fragmentos dentro de uma cabine de fluxo laminar e submetidas ao processo de dissociação enzimática, utilizando colagenase tipo I oriunda de *Clostridium histolyticum*. **3:** Depois do processo de dissociação enzimática, as espermatogônias-tronco foram isoladas por meio de um gradiente de densidade (percoll), utilizando-se quatro gradientes (10%, 20%, 30% 40%). **4:** As bandas contendo maior número de espermatogônias-tronco (banda 20% e 30%) foram submetidas a teste de viabilidade utilizando-se o marcador de membrana, azul de tripan. **5:** Teste para verificação da atividade da fosfatase alcalina para confirmação de espermatogônia-tronco. **6:** Plaqueamento diferencial durante 14 horas como segunda etapa de purificação de espermatogônias tronco. Após plaqueamento diferencial a avaliação da viabilidade celular (**4**) e da atividade da fosfatase alcalina (**5**) foi verificada novamente.

2.4. Caracterização das células tronco espermatogônias isoladas

A caracterização das espermatogônias-tronco isoladas foi realizada através da análise de expressão gênica relativa. Amostras de testículo e células oriundas das etapas do gradiente de percoll e plaqueamento diferencial, foram coletadas no período de desenvolvimento gonadal utilizado para purificação de espermatogônias-tronco. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C para análise da expressão relativa do gene *ddx4*, o qual possui função biológica diretamente associado a células tronco espermatogoniais. O gene da *β -actina* foi utilizado como controle endógeno.

2.4.1. Desenho dos primers para o gene de interesse e endógeno

As sequências dos primers foram desenhadas a partir do alinhamento de sequências de mRNA de diferentes espécies de peixes, depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências da β -actina e *ddx4* de *Astyanax mexicanus* foram utilizadas como entrada no programa Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e as sequências de maior identidade foram obtidas, selecionando aquelas da ordem Characiforme e após outras ordens como Siluriforme e Cypriniforme. As regiões codantes foram obtidas pelo programa Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). As regiões de codantes foram alinhadas com o uso do programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). As regiões conservadas foram selecionadas para o desenho dos primers específicos, utilizando o programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), utilizando como referência as sequências de *A. mexicanus*.

2.4.2. Síntese de cDNA, análise dos primers e confirmação das sequências

A extração de RNA total das amostras foi realizada com Trizol[®] Reagent (ambion #15596026, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen, Hilden, Alemanha). Cerca de 1 µg de RNA, previamente tratado com DNase I (Sigma-Aldrich #SLBR4100V, St. Louis, EUA), foi utilizado na síntese da primeira fita de cDNA, utilizando o kit SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific #4368814, Vilnius, Lithuania), de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA foi utilizado como molde para a amplificação das regiões especificadas pelos primers de β -actina e *ddx4*, através da PCR convencional. Para tal, foi utilizado a DNA polimerase Taq recombinante (Invitrogen), de acordo com as instruções do

fabricante, o cDNA das amostras correspondentes e os primers desenhados, além de tampão, dNTPs e $MgCl_2$ nas concentrações recomendadas pelo fabricante. Os parâmetros de ciclagem utilizado foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação (95°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos), finalizando a 72°C por 10 minutos. A reação foi realizada no termociclador Multigene (Labnet International, Inc). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2% para avaliação da especificidade dos primers, recuperados do gel com o uso do kit E.Z.N.A Gel Extration (OMEGA), clonado no vetor pGEM-T easy (Promega), de acordo com os procedimentos padrão de clonagem, e os vetores enviados para o sequenciamento para confirmação da sequência.

2.4.3. Expressão gênica relativa de *ddx4* nas amostras provenientes da etapa de purificação de espermatogônias tronco

A expressão relativa do gene *ddx4* foi realizada utilizando como gene endógeno a *β -actina*. Desta forma, as curvas padrões para os genes de interesse e endógeno foram estabelecidas, utilizando diluição seriada (1:3) e uma mistura de cDNA de todas amostras. As amostras foram diluídas 1:5. Um controle de reação negativa (NTC) foi usado para cada gene. Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas. Para cada reação, foram utilizados 10 μ L Quanti Nova SYBR Green PCR Master Mix (Quiagen # 208054, Hilden, Germany), 8 μ L de água livre de nucleases, 1 μ L da mistura de primer para os genes alvo nas concentrações de 10 mM e 1 μ L de cDNA. As curvas foram feitas juntas e em duplicata para cada ponto. Foram consideradas curvas com eficiência entre 0,9 e 1,1 e R^2 de 0,99. Os primers utilizados para quantificação em tempo real e PCR convencional estão descritos na Tabela 1.

As condições de amplificação foram: 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação (95°C por 5 segundos e 60°C por 15 segundos). Para a curva de melting

foram utilizadas temperaturas de 60°C a 95°C. A reação foi realizada utilizando o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha). As análises da quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas por PCR em tempo real, com base no método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados no qPCR para expressão gênica das espermatogônia-tronco de piracanjuba (*Brycon orbygnianus*)

Genes	Sequência (5'-3')	Tamanho da Amplificação (PB)
<i>β-actina</i>	F: 5'- CGTGCTGTCTTCCCATCCA-3' R: 5'- TCACCAACGTAGCTGTCCTTCTG-3'	86
<i>ddx4</i>	F: 5'- AAGACCACAGGAACTGAGCG-3' R: 5'- CCCGGTCTCCATGAATGCTT-3'	118

2.5. Criopreservação de células espermatogoniais

Para os experimentos de isolamento e criopreservação de espermatogônia-tronco, foram utilizados quatro machos sexualmente maduros de aproximadamente 8 anos de idade e $739,29 \pm 2,16$ g de peso corporal médio. Os animais foram eutanasiados utilizando uma solução de eugenol a 200 mg/L. Os testículos coletados tiveram um peso médio de $3,07 \pm 0,005$ g. O processo de purificação de espermatogônias-tronco foi realizado como descrito em 2.3. **Isolamento de espermatogônia-tronco.**

2.5.1. Viabilidade e concentração de espermatogônias-tronco purificadas

As espermatogônias-tronco dos quatro exemplares de piracanjuba foram processadas e avaliadas individualmente. Após o plaqueamento diferencial, as células em suspensão foram coletadas, centrifugadas a 300 x g por 8 minutos a 25°C e ressuspensas em 1 mL de meio L-15 suplementado. Posteriormente, a concentração de

espermátogônias-tronco foi determinada microscópicamente utilizando-se câmara de Neubauer. Antes de iniciar os procedimentos de criopreservação, foi realizada a avaliação de viabilidade celular utilizando o corante Trypan Blue (Gibco # 15250061, Grand Island, EUA), o qual tem a capacidade de penetrar na membrana de células danificadas após o processo de dissociação enzimática. Para isso, foram misturados 30 µL da suspensão celular e 5 µL de corante Trypan Blue; seguidamente 10 µL suspensão celular foram colocadas em câmara de Neubauer para contagem de células viáveis e não viáveis, em triplicata para cada amostra. A análise foi realizada em um microscópio (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão).

2.5.2. Criopreservação de espermátogônias-tronco

Antes do congelamento, a suspensão celular foi diluída 1:1 na solução crioprotetora, utilizando 50 µL de suspensão de células e 50 µL de solução crioprotetora, na concentração de $1,4 \times 10^7$ espermátogônias-tronco por mL. As soluções crioprotetoras utilizadas neste experimento, seguiram aquelas descritas por (LINHARTOVÁ et al., 2014). Resumidamente, as soluções crioprotetoras eram compostas de glicose 100 mM e 0,5% de soro de albumina bovina (Inlab confiança # 1870, SP, Brasil) e os crioprotetores: etilenoglicol (Sigma # SHBB4592V, St. Louis, EUA), glicerol (Sigma # 72996TMV, St. Louis, EUA), dimetilsulfóxido (Sigma # SHBG9653V, St. Louis, EUA), dimetilacetamida (Sigma # STBC4643V, St. Louis, EUA) e propanodiol (Sigma # MKBF9063V, St. Louis, EUA). As concentrações dos crioprotetores eram de 2 M, 3 M e 4 M. Como a mistura de suspensão celular e solução crioprotetora foram diluídas 1:1, e portanto, as condições finais de de criopreservação continham as concentrações finais de células e dos reagentes das soluções crioprotetoras a metade dos valores indicados acima. A mistura de soluções crioprotetoras e células foram colocadas em palhetas de criopreservação de sêmen, sendo utilizado 70 µL das misturas de suspensão celular e

solução crioprotetora para envasar cada palheta (IMV Technologies). As palhetas foram seladas com álcool polivinílico (Sigma # 089K0037, St. Louis, EUA), alocadas em criotubos (Corning Incorporated # 430659, DF, México) e os criotubos transferidos para um recipiente de criopreservação, Corning CoolCell (Biocision, CoolCell®|LX). Este recipiente permite o congelamento lento, com o decaimento de temperatura de 1°C por minuto. O recipiente de congelamento foi transferido para freezer a -80°C e mantido por duas horas. Após este período, os criotubos contendo as amostras foram armazenados em nitrogênio líquido a -196°C e mantidos nestas condições por cerca de uma semana. As amostras foram descongeladas em banho maria na temperatura de 30°C durante um minuto. Em seguida, cada palheta foi cortada nas extremidades e a suspensão celular era transferida para microtubo de centrífuga de 1,5 mL e centrifugada a 350 x g por 5 minutos a 25°C (Hermle Labnet # Z326K, Wehingen, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 30 µL de solução de Hanks suplementada e adicionado 5 µL de corante azul de Tripan para análise de viabilidade. Cada amostra foi contada em triplicata usando uma câmera Neubauer e microscópio (Nikon-Ec Q2lipsE Ni, Tóquio, Japão).

2.5.3. Análise estatística

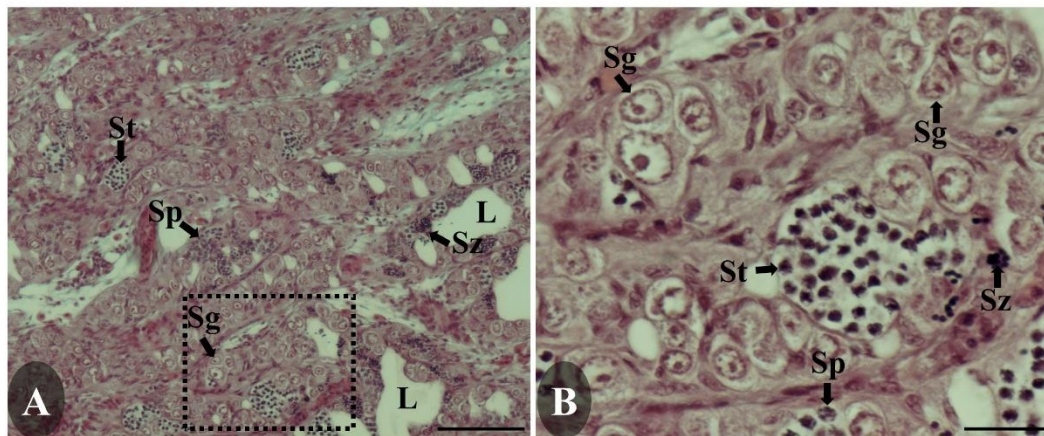
Os dados foram avaliados em triplicata para cada crioprotetor nas diferentes concentrações molares. Os dados foram reportados como média e erro padrão. Os dados foram analisados por homogeneidade, usando o teste de Levene (BROWN; FORSYTHE, 1974) e para normalidade foi utilizado o teste de Cramer-von Mises (TAMURA, 2008). Em seguida, foram avaliados pela ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o software STATISTICA 7.0.

3. RESULTADOS

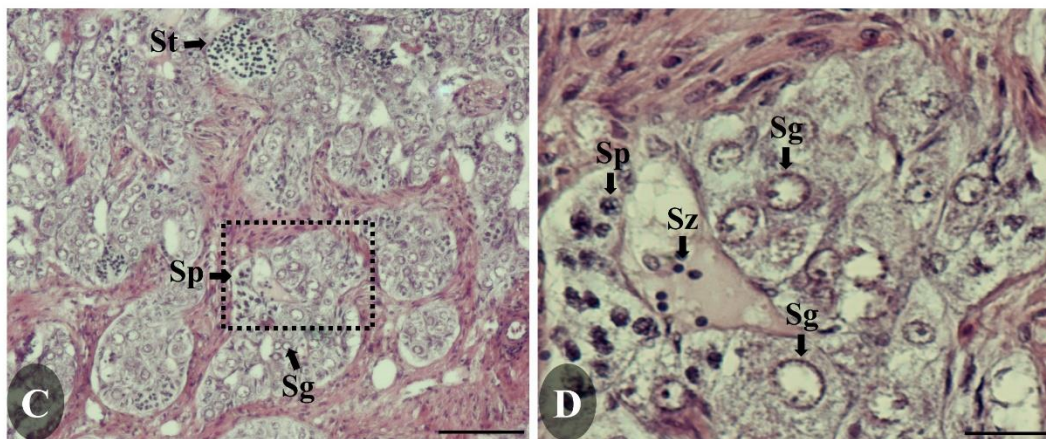
3.1. *Caraterização histológica do testículo de piracanjuba*

Os testículos dos juvenis de piracanjuba são pequenos e translúcidos, com índice gonadosomático (IGS) de $0,01 \pm 0,00$, em fase de desenvolvimento inicial, sendo observado no epitélio germinativo espermatogônias, poucos cistos de espermatócistos, espermatídes e alguns espermatozoides isolados no testículo (Figura 2A-B). Os testículos dos machos adultos coletados no inverno eram translúcidos e facilmente identificáveis, com IGS de $0,07 \pm 0,00$, sendo observada a espermatogênese na fase de regeneração, apresentando grande quantidade de espermatogônias e alguns cistos de espermatócistos e espermatídes, e espermatozoides isolados no testículo (Figura 2C-D). Os testículos dos machos adultos coletados na estação reprodutiva eram grandes e firmes, observando-se uma coloração branqueada, o IGS foi de $0,86 \pm 0,13$, a espermatogênese é ativa com espermatozoides no lúmen testicular (Figura 2E-F). No animal, anterior a retirada do testículo, foi observado a liberação de semên após a realização de uma leve pressão manual na cavidade celomática, no sentido crânio-caudal.

Juvenil (15 meses)



Adulto (Maio-Junho)



Adulto (Novembro – Dezembro)

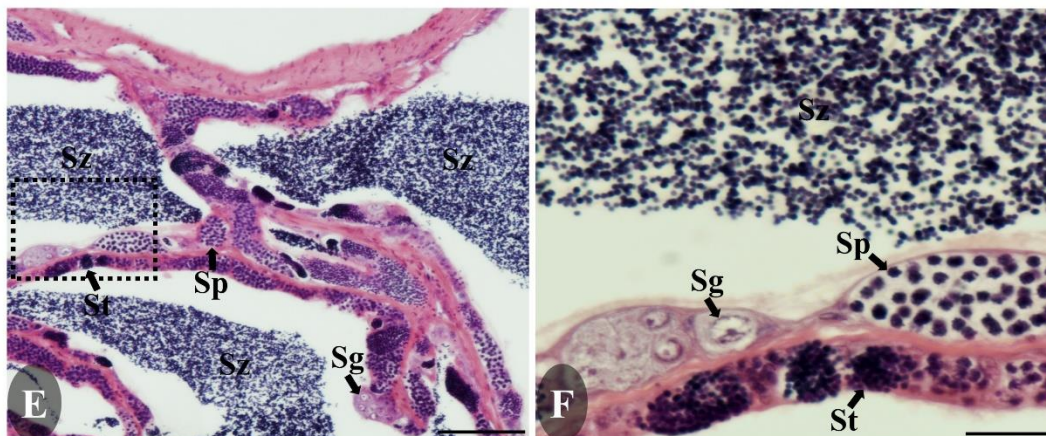


Figura 2. Testículo de adultos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e juvenis (15 meses de idade), coletados de maio à junho e de novembro a dezembro. **A:** Testículo de juvenil em fase de desenvolvimento inicial, observando-se ninhos de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e alguns espermatozoides. **B:** Imagem em maior aumento da área pontilhada em 2A, identificando-se nitidamente ninhos de espermatogônias, alguns espermatócitos, espermátides e alguns espermatozoides. **C:** Testículo de macho adulto coletado em final de maio a início de junho, apresentando a espermatogênese em fase de regeneração, observando-se espermatogônias em proliferação no testículo e alguns espermatócitos, espermátides e alguns espermatozoides isolados. **D:** Imagem em maior aumento da área pontilhada na Figura 2C para

melhor identificação de espermatócitos e espermatozoides. **E:** Testículo coletado de novembro à dezembro, em fase maduro com abundantes espermatozoides no lúmen, poucas espermatogônias foram observadas no epitélio germinativo. **F:** Imagem maior aumento da Figura 2E para identificação de espermatogônias, cisto de espermatócistos e espermátides. Sg: espermatogônias, Sp: espermatócistos, St: espermátides, Sz: espermatozoides, L: lúmen testicular. **Escala:** 200 μ m (A, C, E)- 50 μ m (B, D, F).

3.2. Isolamento de espermatogônias-tronco

A mistura das bandas de 20% e 30% de percoll apresentaram $58,35 \pm 0,03\%$ de pureza de espermatogônias-tronco, contendo outros tipos celulares, tais como espermatócitos ($30,54 \pm 0,02\%$) e espermatozoides ($11,11 \pm 0,05\%$) (Figura 3A). Após o plaqueamento diferencial, foi obtida uma pureza de espermatogônias de $66,00 \pm 0,01\%$, contendo ainda $33,23 \pm 0,01\%$ de espermatócistos e $0,78 \pm 0,02\%$ de espermatozoides (Figura 3B). A viabilidade celular das espermatogônias provenientes do gradiente de percoll foi de $92,94 \pm 0,06\%$, aumentando para $94,59 \pm 0,13\%$ após plaqueamento (Figura 4). As espermatogônias purificadas no gradiente de percoll e plaqueamento diferencial apresentaram maior atividade de fosfatase alcalina que espermatócitos, pela avaliação por fluorescência, indicando que as células purificadas são realmente células tronco (Figura 5).

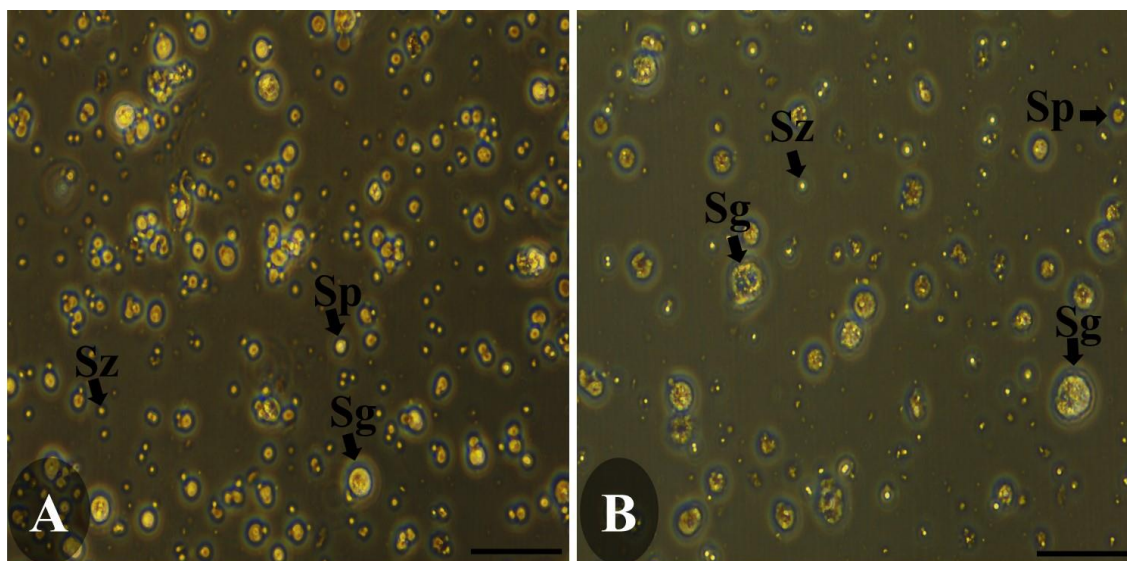


Figura 3. Espermatogônias da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) isoladas através da dissociação enzimática, seguida de gradiente de percoll. **A:** células provenientes do gradiente de percoll. **B:** células oriundas do plaqueamento diferencial. SG: espermatogônia, SP: espermatócistos, SZ: espermatozoides. **Escala:** 50 μ m.

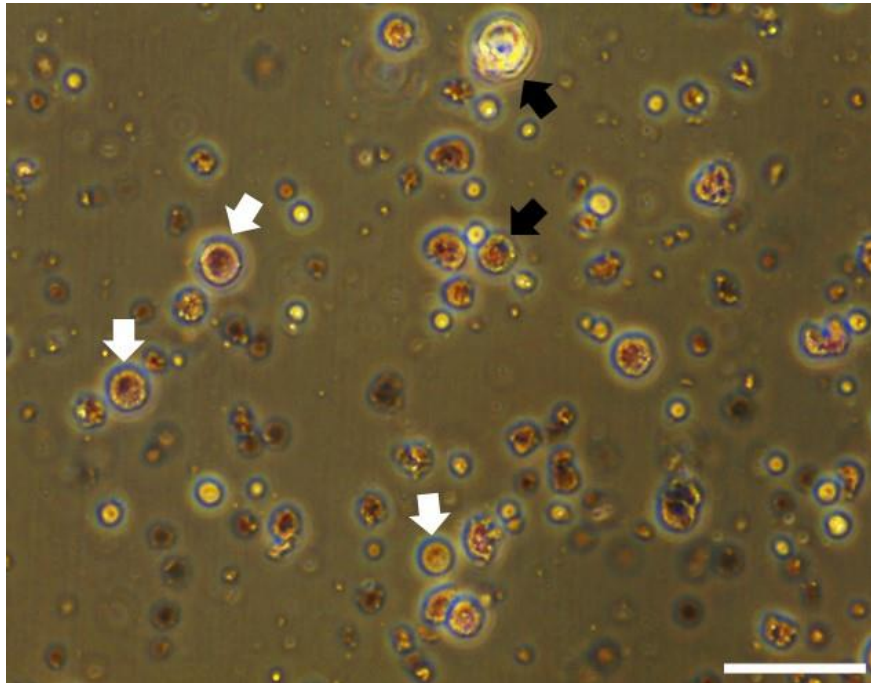


Figura 4. Análise da viabilidade celular das espermatogônias que foram danificadas durante o processo de dissociação enzimática e isolamento celular, usando o marcador de membrana azul de tripan, as setas brancas indicam células viáveis onde o azul de tripan não conseguiu penetrar pela membrana celular. As setas pretas indicam células inviáveis onde o azul de tripan atravessa a membrana celular. **Escala:** 50 μ m.

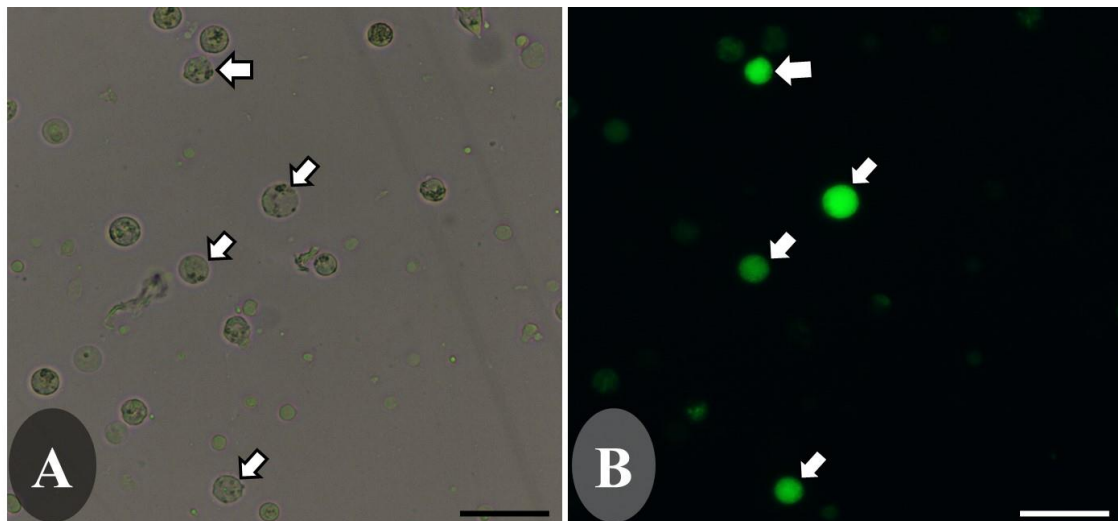


Figura 5. Imagem representativa da atividade da fosfatase alcalina em espermatogônias-tronco provenientes do plaqueamento diferencial. **A:** As setas brancas com contorno preto indicam espermatogônias observadas por microscopia de luz; **B:** Contrafoto da imagem (A) as setas brancas apontam as espermatogonias-tronco marcadas com corante fluorescente. **Escala:** 50 μ m.

3.3. Expressão gênica relativa de *ddx4*

As curvas padrões realizadas para os genes *β -actina* e *ddx4* (Figura 6 e 7A) apresentaram eficiências das amplificações do gene de interesse e do controle endógeno dentro do esperado (0,9 a 1,1). Os pontos amostrais estavam localizados dentro dos limites das curvas (Figura 6 e 7B). Os dados das curvas de melting indicam a formação de um pico principal em uma temperatura específica para cada produto de amplificação, não sendo observada a formação de dímeros para os genes avaliados (Figura 6 e 7 C).

Os resultados da expressão gênica relativa do gene *ddx4* ou *vasa* indicaram que a expressão do gene *ddx4* é cerca de 3,5 vezes maior em células vindas do gradiente de percoll (mistura das bandas 20% e 30%), em relação a gônada e das células após o plaqueamento diferencial (Figura 8). Sugerindo uma diminuição da expressão relativa de *ddx4* nas células oriundas do plaqueamento diferencial em relação às células vindas do gradiente de percoll, mesmo sendo obtido um aumento da pureza de espermatogônias no plaqueamento diferencial. O aumento da expressão relativa de *ddx4* nas células provenientes do gradiente de densidade acontece com o aumento da concentração de espermatogônias nesta fração, e a queda no plaqueamento pode indicar alterações na expressão deste gene durante o cultivo.

3.4. Confirmação das sequências dos genes de piracanjuba

Até o momento foi realizada a confirmação da sequência amplificada para *ddx4* de piracanjuba, o outro produto de amplificação para *β -actina* ainda não foi sequenciado. No sequenciamento da região amplificada pelos primers desenhados para *ddx4* de *B. orbignyanus*, foi verificado um total de 118 pares de bases que apresentou 92,37% de identidade (Blastn) com a mesma região depositada do RNA mensageiro do gene *ddx4* de *Astyanax mexicanus* (NCBI Reference Sequence: XM_022681259.1). Na figura 9, é apresentado gel de agarose na avaliação dos primers desenhados em amostra de cDNA

de testículo de *B. orbignyanus*, e na figura 10 é apresentado o alinhamento das regiões do gene *ddx4* de *A. mexicanus* e *B. orbignyanus*.

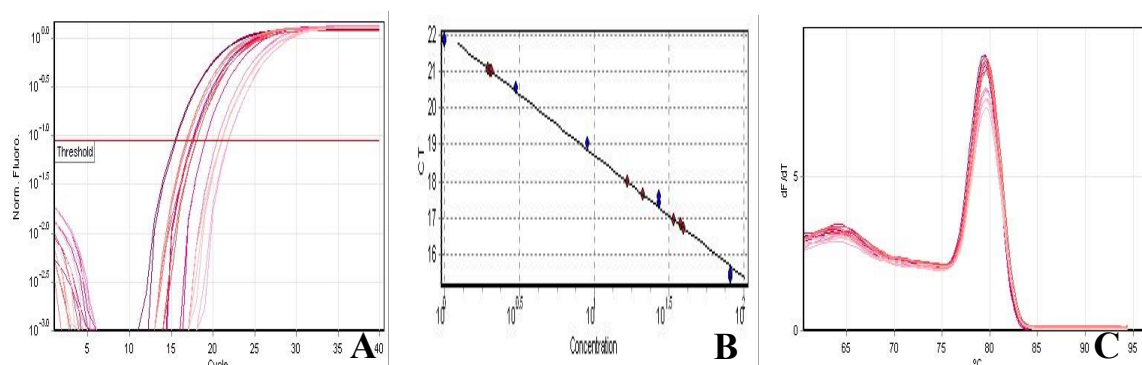


Figura 6. Curva padrão para o gene *ddx4* (A-B), e sua respectiva curva de melting (C).

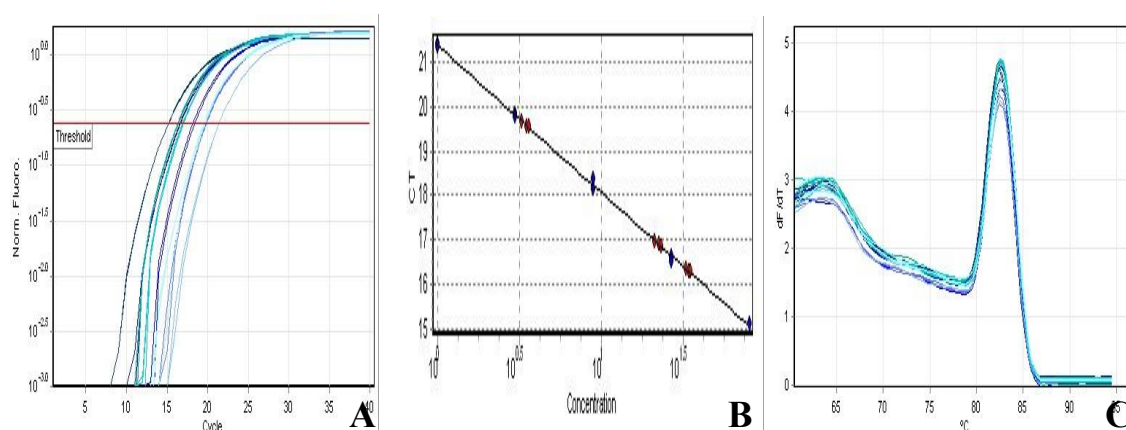


Figura 7. Curva padrão para o gene endogeno *β-actina* (A-B), e sua respectiva curva de melting (C).

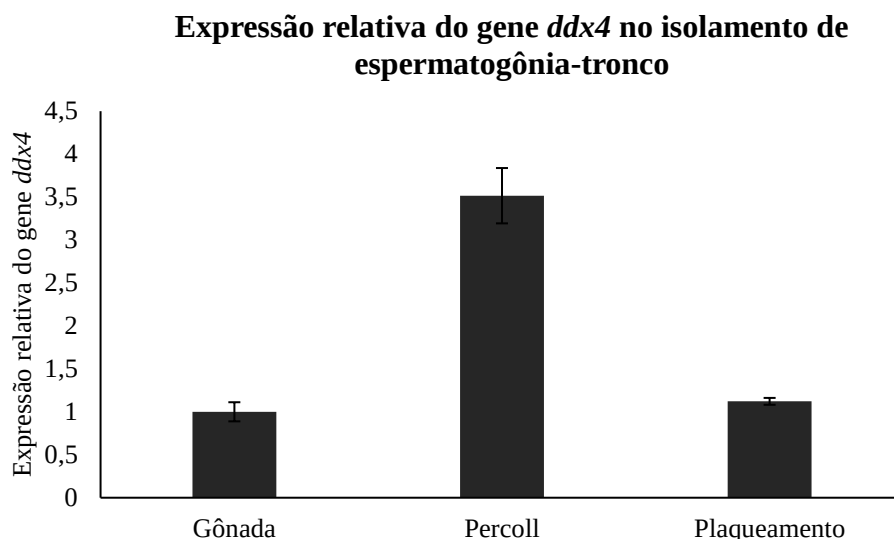


Figura 8. Expressão relativa do gene *ddx4* para testículo (1); gradiente de percoll (3,623008) e plaqueamento diferencial (1,036733).

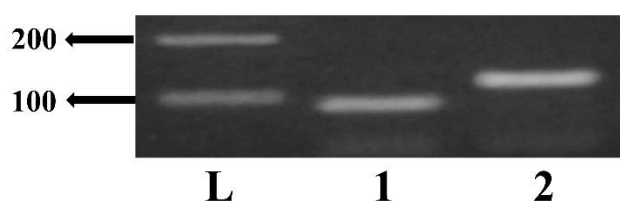


Figure 9. Gel de agarose a 2% na avaliação dos primers desenhados em amostra de cDNA de gônada de *Brycon orbignyanus*. L: Ladder 1 kb plus (Invitrogen); 1: *B. atina*; 2: *ddx4*.

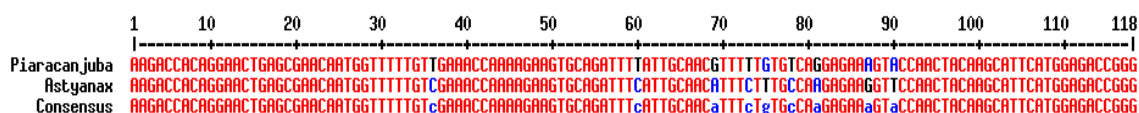


Figure 10. Alinhamento da região amplificada do gene *ddx4* de *Astyanax mexicanus* e *Brycon orbignyanus*.

3.5. Viabilidade das espermatogônias-tronco após criopreservação

A ação protetora para integridade celular durante e após o descongelamento foi observada para os diferentes crioprotetores, enquanto que as células do grupo controle, sem crioprotetores, foram inviáveis após o descongelamento. Na Tabela 2 é resumido os valores de viabilidade celular após o descongelamento. O uso de propanodiol a 1 M, após o descongelamento, apresentou valores de viabilidade similar ao grupo controle antes do

congelamento ($P = 1,000$), não sendo verificado diferença significativa entre estes grupos. Esta condição, foi considerada a melhor solução crioprotetora encontrada para a criopreservação de espermatogônia-tronco de piracanjuba, dentre todas as soluções testadas. Outras soluções crioprotetoras, com molaridades diferentes, tal como propanodiol a 1,5 M ($P = 0,964$), DMA a 1 M ($P = 0,961$) e DMSO a 2 M ($P = 0,036$) apresentaram viabilidade média acima de 60%.

Tabela 2. Viabilidade das células tronco espermatogoniais antes do congelamento e após descongelamento celular da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Os dados foram obtidos vindos de quatro repetições e foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa.

Tratamento		Viabilidade (%)		
CONTROLE PRE-CONGELAMENTO		87,68	$\pm$	5,22 ^a
PROPANODIOL	1 M	90,74	$\pm$	1,85 ^a
	1,5 M	67,57	$\pm$	8,15 ^{ab}
	2 M	55,25	$\pm$	12,41 ^{abc}
DMA	1 M	67,41	$\pm$	12,85 ^{ab}
	1,5 M	40,99	$\pm$	6,47 ^{bcd}
	2 M	29,89	$\pm$	4,04 ^{bcd}
DMSO	1 M	34,85	$\pm$	5,96 ^{bcd}
	1,5 M	51,01	$\pm$	10,94 ^{abc}
	2 M	62,15	$\pm$	6,45 ^{abc}
GLICEROL	1 M	52,49	$\pm$	22,07 ^{abc}
	1,5 M	21,73	$\pm$	5,23 ^{bcd}
	2 M	18,04	$\pm$	6,5 ^{cd}
ETILENOGLICOL	1 M	36,03	$\pm$	4,18 ^{bcd}
	1,5 M	35,35	$\pm$	13,76 ^{bcd}
	2 M	45,66	$\pm$	8,43 ^{abc}
CONTROLE POS-DESCONGELAMENTO		0,00	$\pm$	0,00 ^d
<i>P - value</i>		0,0161		

4. DISCUSSÃO

A caracterização da espermatogênese utilizando animais juvenis de piracanjuba (15 meses de idade) e animais adultos (8 anos de idade) coletados em diferentes épocas do ano (inverno e verão), ou seja antes da estação reprodutiva e durante a estação reprodutiva, nos permitiu identificar o momento ideal para realização do isolamento de espermatogônias-tronco e obter uma maior concentração celular de espermatogônias purificadas, para posteriormente ser utilizadas na criopreservação ou transplante de células. Os testículos dos animais juvenis eram pequenas com $0,01 \pm 0,00$ de IGS e mesmo apresentando espermatogônias, a concentração de espermatogônias-tronco era baixa para realizar a criopreservação a partir de células isoladas ou transplante em animais adultos, como descrito em outros trabalhos (MAJHI et al., 2014; XU et al., 2019). Entretanto, os testículos destes juvenis ainda poderiam ser utilizados para realizar futuros trabalhos de transplante em larvas ou criopreservação de tecidos (MARINOVIĆ et al., 2019; ZHOU et al., 2021).

Os testículos dos animais adultos coletados em Maio-Junho se encontravam no estágio de espermatogênese em regeneração, com $0,07 \pm 0,00$ de IGS, observando-se claramente espermatogônias em abundância na gônada, sendo considerada esta fase de desenvolvimento gonadal a mais indicada para realizar isolamento de espermatogônias-tronco, visando obter altas concentrações das células isoladas. Enquanto que nos testículos dos animais coletados em Novembro-Dezembro, foram observados espermatozoides em abundância no lúmen do testículo, prontos para ser liberados, sendo desvantajoso para isolamento de espermatogônias-tronco, pois a quantidade de espermatozoides seria muito maior que o número de espermatogônias; dificultando o processo de purificação celular. Portanto, trabalhos envolvendo a caracterização histológica e posterior isolamento de espermatogônias estão sendo desenvolvidos com a

finalidade de identificar em que momento os testículos estão produzindo mais células espermatogoniais indiferenciadas e assim obter uma concentração maior e uma melhor purificação destas células, que podem ser utilizadas posteriormente no transplante de células, criopreservação ou cultivo *in vitro* (POURSAEID et al., 2020; ZUPA et al., 2020).

O melhor momento para realizar o isolamento de espermatogônias-tronco de animais adultos de piracanjuba foi então utilizado para o isolamento de espermatogônias-tronco. Testículos de animais foram submetidos ao processo de isolamento pelos métodos de dissociação enzimática, gradiente de densidade de percoll e plaqueamento diferencial. Obtendo um grau de pureza de espermatogônia-tronco, após o plaqueamento diferencial, de $66,00 \pm 0,01\%$, cerca de 8% maior que aquele do gradiente de percoll ($58,35 \pm 0,03\%$), e viabilidade de $94,59 \pm 0,13\%$. Através do plaqueamento diferencial foi possível eliminar principalmente espermatozoides, que passou de cerca de 11% de presença, vindo do gradiente de densidade de percoll, para 0,78% após o plaqueamento. O uso do plaqueamento diferencial no isolamento de espermatogônia-tronco foi realizado em outras espécies, como na truta arco-íris (S. SHIKINA; G.YOSHIZAK, 2008), na tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (LACERDA; COSTA; DE FRANÇA, 2014) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (SILVA et al., 2016), sendo considerada uma etapa importante para o aumento de pureza das células germinativas tronco durante a etapa de purificação. A purificação das células espermatogoniais é importante para a geração de bancos genéticos *in vitro* de alta qualidade, conservando o material genético das espécies em algum grau de ameaça de extinção, como a piracanjuba (*B. orbignyanus*).

Os dados de expressão gênica relativa de *ddx4*, das amostras de gônada, do gradiente de percoll e plaqueamento diferencial, indicaram que na primeira etapa do gradiente de percoll ocorreu aumento da expressão relativa de *ddx4* em relação a gônada.

Este resultado pode ser proveniente do aumento da concentração de espermatogônias em relação a outras células obtido nos gradientes de percoll (20% e 30%). Diversos estudos tem demonstrado que o gene *ddx4* ou *vasa* é um marcador específico de linhas de células germinativas (HARTUNG; FORBES; MARLOW, 2014). Este gene tem sido estudado na tilápia (*Oreochromis niloticus*) onde foi expresso principalmente em espermatogônia, apresentando também uma leve expressão em espermatócitos primários (KOBAYASHI; KAJIURA-KOBAYASHI; NAGAHAMA, 2000). Nas espécies neotropicais como *Rhamdia quelen* conhecida comumente como jundiá e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o *ddx4* foi expresso principalmente em espermatogônia do tipo A e B, com uma leve expressão em espermatídes e não sendo detectada a expressão em espermatozoides (BERTALERO et al., 2021; RICCI et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2019). Este gene também foi expresso em oogônias tipo A e em oócitos de animais adultos de tambaqui, uma vez que nesta fase ocorre um intenso acúmulo de RNA que será herdado para gerações seguintes. Para o jundiá (*R. quelen*) outros genes como *plzf* e *pou5f3* também tem mostrado níveis de expressão elevados em frações celulares enriquecidas por espermatogônias indiferenciadas do tipo A (LACERDA et al., 2019).

Apesar do aumento da pureza de espermatogônias na etapa de plaqueamento diferencial em relação ao gradiente de percoll, foi verificado decréscimo no nível de expressão relativa de *ddx4* na etapa de plaqueamento em relação ao gradiente de percoll. No entanto, com o aumento da pureza de espermatogônias seria esperado aumento da expressão relativa de *ddx4* no plaqueamento em relação ao gradiente de percoll. Uma possível explicação seria que durante o tempo de cultivo, as células podem estar sendo comprometidas quanto a sua natureza intrínseca de célula tronco nestas condições submetidas, uma vez que estas células são dependentes de interações com outros tipos celulares, como as células de Sertoli. Outro fator, poderia ser a viabilidade estar sendo

alterada. Apesar de ser verificada alta viabilidade após o plaqueamento, o método utilizado neste estudo foi o azul de tripan, que detecta membranas celulares não integras, mas pode não marcar as células em processo apoptótico, que pode ser iniciado desde o processo de dissociação enzimática. O tempo necessário para obtenção das espermatogônias-tronco após o plaqueamento, que se inicia na coleta de gônada, passando por dissociação enzimática e gradiente de percoll, é de cerca de 20 horas, enquanto que no gradiente de percoll seria em torno de 5 horas. Assim como no isolamento de espermatogônia de piracanjuba, tem sido verificado em nosso laboratório, a queda de expressão gênica de *ddx4* no plaqueamento em relação ao gradiente de percoll, no isolamento de oogônias em duas outras espécies (dados não publicados), e as vezes acompanhada pela queda de expressão do próprio gene endógeno. Essa queda na expressão, pode dificultar a análise comparativa da expressão entre gônada, gradiente de percoll e plaqueamento se ocorre variação na expressão do gene endógeno. Portanto, técnicas como TUNEL para avaliação de células em apoptose e BrdU para detecção de atividade mitótica, futuramente poderiam ser aplicadas neste trabalho, como foi feito no cultivo *in vitro* de espermatogônia A na truta arco-íris (S. SHIKINA; G.YOSHIZAK, 2008; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2010). Nestes trabalhos, diferentes fatores de enriquecimento solúveis, utilizados nos meios de cultura, influenciaram no aumento ou diminuição do número de espermatogônia durante o período de cultivo, assim como em sua atividade apoptótica. O uso de tais fatores no cultivo celular parece influenciar na capacidade das células de serem incorporadas nas gônadas receptoras após o transplante, em comparação com as espermatogônias transplantadas vindas do gradiente de densidade (SHIKINA; YOSHIZAKI, 2010). Embora o plaqueamento diferencial seja um método eficaz para obtenção de alta pureza de células germinativas, as propriedades das células podem mudar durante o período de cultura *in vitro*. Portanto, a análise de expressão

gênica é uma importante ferramenta para avaliar os níveis de expressão de RNA nas células germinativas, indicando a característica da célula a ser transplantada e possibilita a escolha da melhor etapa de purificação celular a ser utilizada no transplante de células ou para sua criopreservação no nitrogênio líquido.

A fosfatase alcalina tem sido utilizada em camundongos para identificar espermatogônia tipo A em cultivos *in vitro* (VAN DER WEE et al., 2001). Em humanos esta técnica também tem sido utilizado para avaliar o número de espermatogônias em crianças com problemas de criptorquidia (THORUP et al., 2013). Desta forma, foi utilizada a fosfatase alcalina para identificar as espermatogônias purificadas no gradiente de percoll e plaqueamento diferencial, sendo observada alta atividade da fosfatase alcalina, indicando que as células purificadas eram realmente células tronco.

A criopreservação de células é uma importante estratégia para conservar material com alto valor genético. Neste trabalho, diferentes crioprotetores em diferentes concentrações molares foram avaliados para criopreservação de células espermatogoniais isoladas de piracanjuba. A melhor solução crioprotetora encontrada foi o propanodiol a 1 M, apresentando viabilidade de $90,74\% \pm 0,19$ após o descongelamento. O isolamento e a criopreservação da espermatogônia-tronco têm sido usados em outras espécies de peixes, como *Tinca tinca*, obtendo uma viabilidade entre 57 e 50%, usando glicerol a 1,5 M (LINHARTOVÁ et al., 2014), e 50% usando DMSO a 3 M (MARINOVIĆ et al., 2017). Os resultados obtidos neste estudo foram altamente eficientes para criopreservação de espermatogônias-tronco de piracanjuba, com alta porcentagem de viabilidade, quando comparados com os resultados de outros estudos. A construção de uma banco genético *in vitro* de piracanjuba é de extrema importância, uma vez que é uma espécie em perigo de extinção. Estas células podem ser armazenadas e utilizadas em transplante, como medida de conservação através de geração de quimera germinativa.

5. CONCLUSÃO

Nos meses de maio à junho foi observado o maior número de espermatogônias nos testículos de animais adultos de piracanjuba (*B. orbignyanus*), sendo este período indicado para a realização do isolamento destas células. O isolamento de espermatogônias-tronco a partir de juvenis apresenta baixo rendimento de células purificadas, necessitando o uso de muitos animais, o que inviabiliza o seu uso em animais ameaçados de extinção. O isolamento de células tronco espermatogoniais de piracanjuba, pelos métodos de dissociação enzimática, gradiente de densidade de percoll e plaqueamento diferencial, resultou em grau de pureza de espermatogônia-tronco, sendo maior a pureza no plaqueamento diferencial. Porém, o plaqueamento diferencial pode alterar a expressão de genes importantes característicos de células tronco e, portanto, as células oriundas do gradiente de densidade de percoll parecem ser mais adequadas para o uso em transplante e criopreservação. Apesar de apresentar cerca de 8% a menos de pureza que o plaqueamento diferencial, as espermatogônias vindas do gradiente de densidade ainda possuem maior expressão do gene *ddx4*. As espermatogônias-tronco, oriundas das duas etapas de purificação, apresentam alta atividade da fosfatase alcalina em relação aos outros tipos celulares, como espermatíde e espermatócitos. A solução de propanodiol a 1 M foi a melhor solução crioprotetora de espermatogônias-tronco de piracanjuba (*B. orbignyanus*). Esta solução pode ser utilizada para a criopreservação de espermatogônias-tronco de piracanjuba e posterior transplante de células utilizando um receptor estéril. Estes resultados em conjunto formam uma base sólida para a purificação de espermatogônias-tronco de piracanjuba e seu uso em transplante e criopreservação.

6. REFERÊNCIAS

ADAMOV, N. S. DE M. et al. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, 2017.

AGOSTINHO, Â. A., THOMAZ, S. M., & GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 70–78, 2005.

BAR, I. et al. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 12, p. 2051–2064, 2016.

BERTALERO, G. et al. Co Co Co. n. xxxx, p. 1–2, 2021.

BERTOLINI, R. M. et al. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, p. 68–74, 2018.

BERTOLINI, R. M. et al. Strategies for aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*. **Aquaculture International**, v. 28, n. 1, p. 127–137, 2020.

BIODIVERSIDADE, ICMB. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 2018.

BORBA M.R., FRACALOSSO D.M., P. L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquac Nutr.**, 2006.

BRINSTER, C. J. et al. Restoration of fertility by germ cell transplantation

requires effective recipient preparation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 412–420, 2003.

BROWN-PETERSON, N. J. et al. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, n. 1, p. 52–70, 2011.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364–367, 1974.

CAVALCANTI, C. D. A. **Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (Brycon orbignyanus, PICES: CHARACIDAE) e aplicação da técnica de digestibilidade in vitro.** [s.l: s.n.].

CINALLI R.M., RANGAN P., L. R. **Germ cells are forever.** [s.l: s.n.].

COELHO, G. C. Z. et al. Preparation of a fish embryo for micromanipulation : staging of development , removal of chorions and traceability of PGC in *Prochilodus lineatus*. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 65, p. 57–65, 2019.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H. et al. 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.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H. et al. Preliminary study on testicular germ cell isolation and transplantation in an endangered endemic species *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, 2019.

DO NASCIMENTO, N. F. et al. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471, p. 163–171, 2017.

DO NASCIMENTO, N. F. et al. High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock: The first case in Neotropical characins. **Aquaculture**, v. 520, n. December 2019, p. 734938, 2020.

ENGLUND, M. C. O.; SARTIPY, P.; HYLLNER, J. Human embryonic stem cells. **Regenerative Medicine: From Protocol to Patient**, v. 10, p. 169–186, 2011.

FUJIMOTO, T. et al. Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 430–437, 2008.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. [s.l.] Unesp, 2003.

GOLPOUR, A. et al. Short-term storage of sterlet *Acipenser ruthenus* testicular cells at -80 °C. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 154–156, 2016.

GOTO, R.; SAITO, T. A state-of-the-art review of surrogate propagation in fish. **Theriogenology**, v. 133, p. 216–227, 2019.

HAGEDORN, M. M. et al. Cryopreservation of Fish Spermatogonial Cells: The Future of Natural History Collections. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

HARTUNG, O.; FORBES, M. M.; MARLOW, F. L. Zebrafish vasa is required for germ-cell differentiation and maintenance. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 10, p. 946–961, 2014.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei:Characoidei). **Bull Br Mus Nat Hist (Zool.)**, v. 43, p. 1–47, 1982.

ITO, L. S. et al. Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (pisces, atheriniformes).

Physiological and Biochemical Zoology, v. 81, n. 6, p. 762–774, 2008.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Mechanisms of Development**, v. 99, n. 1–2, p. 139–142, 2000.

LACERDA, S. M. DOS S. N.; COSTA, G. M. J.; DE FRANÇA, L. R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. **General and Comparative Endocrinology**, v. 207, p. 56–65, 2014.

LACERDA, S. M. S. N. et al. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. 1–9, 2010.

LACERDA, S. M. S. N. et al. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 3–11, 2013.

LACERDA, S. M. S. N. et al. Duration of spermatogenesis and identification of spermatogonial stem cell markers in a Neotropical catfish, Jundiá (*Rhamdia quelen*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, p. 249–259, 2019.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: [s.n.], p. 174–181.

LINHARTOVÁ, Z. et al. Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). **Czech Journal of Animal Science**, v. 59, n. 8, p. 381–390, 2014.

LOPERA-BARRERO, N. M. Diversidade Genética de *Brycon orbignyanus*. p.

110, 2007.

MAJHI, S. K. et al. Germ cell transplantation using sexually competent fish: An approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. 1–8, 2009.

MAJHI, S. K. et al. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

MAJHI, S. K. et al. Heat and chemical treatments in adult *Cyprinus carpio* (Pisces cypriniformes) rapidly produce sterile gonads. **Animal Reproduction Science**, v. 183, n. June, p. 77–85, 2017.

MAJHI, S. K. et al. Depletion of endogenous germ cells in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) by heat–chemical treatments. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 12, p. 1560–1566, 2019.

MARINOVIĆ, Z. et al. Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing. **General and Comparative Endocrinology**, v. 245, p. 77–83, 2017.

MARINOVIĆ, Z. et al. Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

NASCIMENTO, N. F. DO et al. The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism. **Aquaculture**, v. 514, n. August 2019, p. 734432, 2020.

NÓBREGA, R. H. et al. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–16, 2010.

NOZU, R.; NAKAMURA, M. Influence of prolonged cultivation on sexual characteristics of sterilized female tilapia, *Oreochromis mossambicus*, induced by high-temperature treatment. **Aquaculture**, v. 524, n. March, p. 735245, 2020.

O'CONNOR, M. D. et al. Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 5, p. 1109–1116, 2008.

OKUTSU, T. et al. Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 6, p. 685–693, 2006.

OKUTSU, T. et al. Production of Trout Offspring from Triploid Salmon Parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 50, 2007.

PANDIT, N. P. et al. High temperature-induced sterility in the female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 213, p. 110–117, 2015.

PEREIRA-SANTOS, M. Androgênese em *Astyanax altiparanae* : Ferramenta de Reconstituição em Peixes. 2017.

PIVA, L. H. et al. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? **Theriogenology**, v. 108, p. 239–244, 2018.

PONJARAT, J. et al. Evidence of dramatic sterility in F 1 male hybrid catfish [male *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) × female *C. macrocephalus* (Günther, 1864)] resulting from the failure of homologous chromosome pairing in meiosis I. **Aquaculture**, v. 505, n. February, p. 84–91, 2019.

PORTO-FORESTI, F. et al. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte

e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 67, p. 15–19, 2001.

PORTO-FORESTI, F. et al. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 101–116, 2005.

POURSAEID, S. et al. Isolation, characterization, in vitro expansion and transplantation of Caspian trout (*Salmo caspius*) type a spermatogonia. **General and Comparative Endocrinology**, v. 289, p. 113341, 2020.

REUNOV, A. et al. Nuage constituents arising from mitochondria: Is it possible? **Development Growth and Differentiation**, v. 42, n. 2, p. 139–143, 2000.

RICCI, J. M. B. et al. Characterization of vasa homolog in a neotropical catfish, Jundiá (*Rhamdia quelen*): Molecular cloning and expression analysis during embryonic and larval development. **Gene**, v. 654, n. 2017, p. 116–126, 2018.

ROCHA, N. R. DE A. Espermatozoide, embrião ou adulto de: qual a fase do desenvolvimento é mais sensível aos efeitos toxicológicos de herbicidas presentes na água. 2019.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. DEL P. et al. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 56–63, 2010.

S. SHIKINA, S. I.; G.YOSHIZAK. Culture Conditions for Maintaining the Survival and Mitotic Activity of Rainbow Trout Transplantable Type A Spermatogonia. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 537, n. 14190, p. 8–9, 2008.

S.M.S.N. LACERDA, S.R. BATLOUNI, S.B.G. SILVA, C.S.P. HOMEM, L. R.

F. Germ cell type Days. **Anim Reprod**, v. 55, n. 31, 2006.

SAITO, T. et al. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation1. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 1, p. 159–166, 2008.

SAITO, T. et al. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1–8, 2011.

SANTOS, M. Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae). **Aleph**, p. 84 f. : il., 2014.

SEKI, S. et al. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–11, 2017.

SHIKINA, S.; YOSHIKAWA, G. Improved In Vitro Culture Conditions to Enhance the Survival, Mitotic Activity, and Transplantability of Rainbow Trout Type A Spermatogonia1. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 268–276, 2010.

SILVA, M. A. et al. Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 230–231, p. 48–56, 2016.

TAKEUCHI, Y. Generation of Live Fry from Intraperitoneally Transplanted Primordial Germ Cells in Rainbow Trout. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1142–1149, 2003.

TAKEUCHI, Y. et al. Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1055–1063, 2009.

TAKEUCHI, Y. et al. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock. **Aquaculture**, v. 494, p. 45–56, 2018.

TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. 4, p. 380–389, 2001.

TAMURA, H. 済無No Title No Title. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 287, 2008.

THORUP, J. et al. The relation between adult dark spermatogonia and other parameters of fertility potential in cryptorchid testes. **Journal of Urology**, v. 190, n. 4 SUPPL, p. 1566–1571, 2013.

VAN DER WEE, K. S. et al. Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type a spermatogonia. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 696–704, 2001.

VASCONCELOS, A. C. N. et al. Isolation and characterization of a germ cell marker in teleost fish *Colossoma macropomum*. **Gene**, v. 683, n. October 2018, p. 54–60, 2019.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 361–368, 2012.

WONG, T.-T. et al. Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae¹. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 6, p. 1190–1197, 2011.

XU, D. et al. Germ cell-less hybrid fish: Ideal recipient for spermatogonial

transplantation for the rapid production of donor-derived sperm. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 2, p. 492–500, 2019.

YASUI, G.S., T. FUJIMOTO, AND K. A. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. **Aquaculture**, p. S140–S144, 2010.

YASUI, G. S. et al. Improvement of gamete quality and its short-term storage: An approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 39, n. 11, p. 464–470, 2014.

YOSHIKAWA, H. et al. Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells. **Genetics**, v. 209, n. 2, p. 507–521, 2018.

YOSHINAGA, T. T. et al. Testicular subcutaneous allografting followed by immunosuppressive treatment promotes maintenance of spermatogonial cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 112, n. December 2019, p. 108–115, 2021.

YOSHIKAWA, G. et al. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout (Development 137, (1227-1230)). **Development**, v. 137, n. 9, p. 1584, 2010.

ZARDO, É. L. et al. Gonadal development period and sexual differentiation through histological analysis in *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Bryconidae). **Aquaculture**, v. 539, n. May 2020, 2021.

ZHOU, L. et al. Successful Spermatogonial Stem Cells Transplantation within Pleuronectiformes: First Breakthrough at inter-family Level in Marine Fish. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 15, p. 4426–4441, 2021.

ZUPA, R. et al. Meagre *argyrosomus regius* (Asso, 1801) stem spermatogonia: Histological characterization, immunostaining, in vitro proliferation, and

cryopreservation. **Animals**, v. 10, n. 5, 2020.

Capítulo II. Esterilização de lambari *Astyanax altiparanae* com ênfase especial para ser receptor de células germinativas de piracanjuba *Brycon orbignyanus*

RESUMO

Este capítulo trata das estratégias utilizadas para a esterilização do lambari de rabo amarelo para serem receptores de células germinativas de piracanjuba. Lambaris adultos diploides, juvenis diploides e triploides foram submetidos à esterilização química, sendo utilizada a administração de busulfan em alta temperatura (35°C). Três experimentos foram realizados visando a total eliminação de células germinativas na gônada de lambari. No experimento 1, duas concentrações de busulfan (15 mg/kg e 40 mg/kg) foram avaliadas em machos adultos diploides, sendo administradas cinco dosagens de busulfan por animal, com intervalos de 10 dias entre cada aplicação. No experimento 2, juvenis receberam quatro aplicações de busulfan, realizadas semanalmente, nas concentrações de 40 mg/kg, 50 mg/kg e 60 mg/kg. No experimento 3, juvenis machos e fêmeas triploides, produzidos mediante manipulação cromossômica, receberam três aplicações de busulfan semanalmente, na concentração de 50mg/kg. No experimento 4, foram produzidos animais híbridos triploides e após 10 meses de idade foi avaliado o crescimento gonadal. A esterilidade dos animais em todos experimentos foi avaliada mediante histologia convencional. No experimento 1, a depleção da espermatogênese foi completa em ambos tratamentos. Entretanto, um mês após finalizar o tratamento de esterilização química, a espermatogênese foi novamente ativada, sendo mais acentuada na dosagem de 15 mg/kg, observando-se a presença de espermatozoides. Na dosagem de 40 mg/kg, apenas algumas regiões do testículo apresentavam espermatogônias e espermátides. No experimento 2, a depleção completa da espermatogênese foi observada nos testículos de juvenis, em todas as dosagens administradas. No entanto, após a quarta aplicação, os animais apresentaram alta taxa de mortalidade. Nas fêmeas, após a primeira aplicação, foi observada a redução do ovário e o atrofiamento das lamelas ovígeras em todos os tratamentos, porém não foi obtida a total depleção da oogênese ao término do tratamento com busulfan. No experimento 3, os juvenis machos triploides apresentaram a depleção total da espermatogênese, sendo observado apenas algumas espermatogônias nos testículos no período de um mês após o término do tratamento. Nas fêmeas, foram observados apenas alguns oócitos isolados no ovário, após o término do tratamento químico. Através dos resultados obtidos. No experimento 4, foi confirmada a esterilidade completa nos machos híbrido triploides, enquanto as fêmeas apresentavam oogônias e oócitos. Portanto, os lambaris juvenis triploides machos e híbridos adultos triploides machos são os mais indicados para serem receptores de células germinativas.

Palavras chave: oogênese, espermatogênese, receptores de células germinativas, depleção da gametogênese, manipulação cromossômica e esterilização química.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

- Obter lambaris (*Astyanax altiparanae*) estéreis para atuarem como receptores de células germinativas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), visando a geração de quimeras germinativas.

1.2 Objetivos específicos

- Induzir a esterilidade de machos adultos diploides de lambari *A. altiparanae*, utilizando o método de esterilização química busulfan.
- Induzir a esterilidade de juvenis machos e fêmeas diploides de lambari *A. altiparanae*, utilizando o método de esterilização química busulfan.
- Induzir a esterilidade de machos e fêmeas juvenis triploides de lambari *Astyanax altiparanae*, a associação as técnicas de manipulação cromossômica e esterilização química busulfan.
- Comparar a eficiência da esterilização de lambaris adultos e juvenis diploides pelo método de esterilização química, aclimatados em alta temperatura (35°C).
- Comparar a eficiência da esterilização de lambaris juvenis diploides e triploides pelo método de esterilização química, aclimatados em alta temperatura (35°C).
- Identificar a melhor estratégia de esterilização de lambari para a geração de receptores de células germinativas de piracanjuba.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Três experimentos foram realizados separadamente, sendo cada um deles considerado uma estratégia diferente para obtenção de *Astyanax altiparanae* estéreis. Todos os experimentos utilizaram a esterilização química pelo agente busulfan, em animais aclimatados a 35°C. Esta temperatura pode ser considerada alta para a espécie, uma vez que nos experimentos preliminares de aclimação, os animais não suportaram temperaturas acima de 35°C e vieram a óbito durante o processo de aclimação. Além disso, a manutenção da temperatura acima de 35°C era difícil de ser mantida, bem como a manutenção dos sistemas de recirculação fechados utilizados. O uso das diferentes estratégias teve como objetivo a obtenção de receptores que apresentassem a depleção total da gametogênese nas gônadas, sem a retomada deste processo por um longo período. Desta forma, obtendo receptores ideais para a realização do transplante de células germinativas. As metodologias utilizadas em cada experimento são descritas a seguir.

2.1 Experimento 1: Esterilização de lambaris adultos diploides

Neste experimento, apenas machos adultos de lambari (*Astyanax altiparanae*) foram utilizados para a esterilização. Os procedimentos foram realizados de acordo com trabalhos previamente publicados de (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015; MAJHI et al., 2017), com algumas modificações, sendo utilizadas duas concentrações diferentes do agente químico busulfan, de 15 mg/kg e 40 mg/kg (busulfan/peixe), administradas cinco vezes em cada animal, com intervalos de 10 dias entre cada aplicação.

Um total de 144 peixes foram utilizados neste experimento. Os peixes (n= 12) foram mantidos em aquários de 60 L, em sistema de recirculação fechado, com aeração constante e temperatura controlada, sendo os alimentados duas vezes ao dia. Inicialmente, os peixes foram aclimatados a 28°C durante uma semana antes do início do experimento.

Posteriormente, a temperatura da água foi aumentada um grau por dia até atingir 35°C e mantida por uma semana nesta temperatura, antes de iniciar o tratamento com busulfan. O experimento foi dividido em quatro grupos: controle (C15) com a administração de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma #472301, St. Louis, EUA) diluído em solução de Ringer, referente a quantidade usada de DMSO na preparação da solução de busulfan a 15 mg/kg; controle (C40) com a administração de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma #472301, St. Louis, EUA) diluído em solução de Ringer, referente a quantidade usada de DMSO na preparação da solução de busulfan a 40 mg/kg; grupo (B15) com administração de busulfan na dosagem de 15 mg/kg e grupo (B40) com administração de busulfan na dosagem de 40 mg/kg. As aplicações foram realizadas via cavidade intracelomática. Cinco aplicações de soluções de DMSO e busulfan foram realizadas em cada grupo, com intervalos de 10 dias entre cada aplicação. Dez dias após a última aplicação, a temperatura foi reduzida um grau por dia até atingir a temperatura de 28°C. Posteriormente, os peixes foram mantidos por mais um mês a 28°C. O cronograma das etapas de aplicação de busulfan e coleta das gônadas está esquematizado na Figura 4.

2.2 Experimento 2: Esterilização de lambaris juvenis diploides

Peixes juvenis de lambari, com 60 dias após a eclosão, foram utilizados neste experimento, visando a esterilização no início da formação da gônada. De acordo com trabalhos prévios (ADOLFI et al., 2015), a formação das gônadas é iniciada aos 58 dias após a eclosão nas fêmeas e 73 dias após a eclosão nos machos. As dosagens de busulfan, 40 mg/kg, 50mg/kg e 60 mg/kg, utilizadas neste experimento foram baseadas em estudos prévios (PACCHIARINI et al., 2014).

Os peixes utilizados neste experimento foram provenientes da desova seminatural de lambari *A. altiparanae*. Casais de lambaris foram submetidos à indução hormonal com hipófises de carpa, sendo aplicadas duas dosagens: a primeira dosagem de 0,3 mg/kg e a

segunda de 3 mg/kg (hipófise/peixe) aplicada seis horas após a primeira. Nos machos foram aplicadas apenas uma dose de 3 mg/kg, juntamente com a segunda dose de indução nas fêmeas. Após a desova, os casais foram retirados do aquário e os embriões foram coletados e colocados em incubadoras flutuantes até a eclosão. As larvas foram transferidas e mantidas em sistema de recirculação fechado, com aeração constante e temperatura controlada (28°C), sendo alimentadas duas vezes ao dia, de acordo com protocolo previamente estabelecido (BERTOLINI et al., 2018). Aos dois meses de idade, os juvenis foram redistribuídos, na densidade de 31 peixes por aquário de 60 L em sistema de recirculação fechado. Antes de iniciar o experimento de esterilização, os animais foram aclimatados da mesma forma descrita no experimento 1.

Após aclimação, os animais foram divididos em quatro grupos, sendo três grupos referentes ao tratamento com busulfan em diferentes dosagens (40 mg/kg, 50 mg/kg e 60 mg/kg). Apenas grupo controle foi utilizado neste experimento. As aplicações foram administradas semanalmente, sendo aplicadas quatro dosagens em cada grupo. Neste experimento foram utilizados machos e fêmeas uma vez que aos dois meses, os animais não apresentavam características sexuais externas, impossibilitando a diferenciação de machos e fêmeas. O cronograma das etapas de aplicação de busulfan e coleta das gônadas está esquematizado na Figura 4.

2.3 Experimento 3: Esterilização de lambaris juvenis triploides

Neste experimento foi utilizada a associação de duas metodologias de esterilização, a manipulação cromossômica associada a esterilização química, para geração de receptores de células germinativas. Resultados prévios realizados com manipulação cromossômica para geração de lambaris triploides indicaram esterilidade nas fêmeas, porém com presença de células germinativas, enquanto alguns machos chegavam a produzir sêmen (FERREIRA DO NASCIMENTO et al., 2017). Desta forma,

quando se realizava transplante de células germinativas nos indivíduos triploides, estas células não conseguiam entrar no interior do epitélio germinativo da gônada por impedimento físico (experimentos preliminares). Baseado nestes dados e nos resultados do experimento 2 (sendo escolhida a dosagem de 50 mg/kg), foi utilizada a esterilização química de lambaris juvenis triploides, visando a depleção da gametogênese e possibilitar a entrada das células transplantadas no epitélio germinativo da gônada.

2.3.1 Produção de lambaris triploides através da manipulação cromossômica

A coleta de gametas e a fertilização *in vitro* foi realizada de acordo com os protocolos previamente reportados (YASUI et al., 2014). Para a geração de receptores de lambaris juvenis triploides, machos e fêmeas de lambari (*A. altiparanae*) foram utilizados. Duas dosagens foram aplicadas, a primeira na concentração de 0.3 mg/kg para as fêmeas e após seis horas desta aplicação, as fêmeas receberam a segunda dose na concentração de 3 mg/kg. Os machos receberam apenas uma dose de extrato de hipófise de carpa na concentração de 3 mg/kg, junto com a aplicação da segunda dose das fêmeas. A triploidização foi realizada seguindo o protocolo de (ADAMOV et al., 2017), para isto, os ovos fecundados de lambaris foram submetidos a choque térmico de temperatura a 40°C, dois minutos após a fertilização, com duração de dois minutos, e retornaram para água a 26°C, sendo acondicionados em peneiras e colocados em aquários de 60 L com aeração constante (Figura 1). Três dias após eclosão, as larvas foram alimentadas com nauplios de artêmia salina recém eclodidos, seguindo o protocolo estabelecido por Bertolini et al., 2018. Dez dias após eclosão, as larvas triploides de lambari (*A. altiparanae*), foram transferidas para tanques de alvenaria de (2 × 4 × 1 m³) alimentadas duas vezes ao dia. Dois meses após eclosão os animais triploides foram selecionados por meio de citometria de fluxo e posteriormente sometidos a tratamento com busulfan.

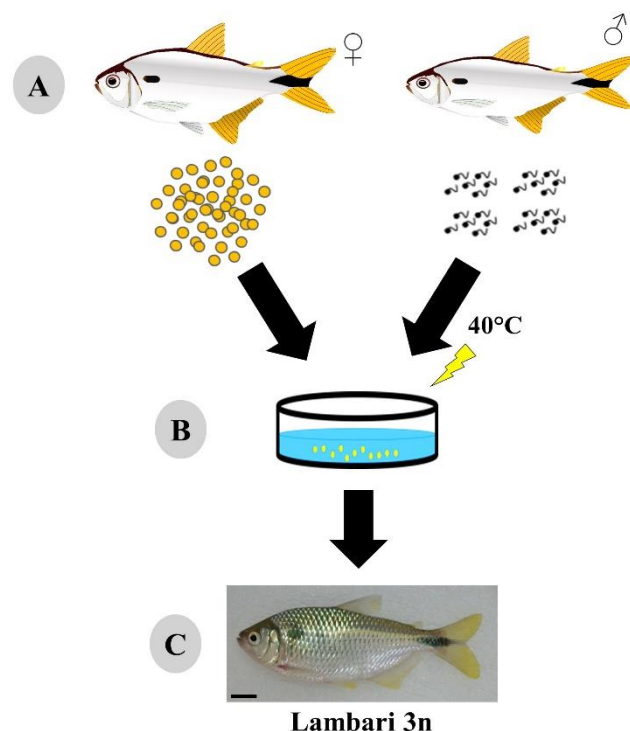


Figura 1. Esquema ilustrativo do processo para obtenção de receptores triploides através da manipulação cromossômica. **A:** Após indução hormonal os ovos de fêmeas de lambari (*Astyanax altiparanae*) foram coletados **B.** Os ovos foram fertilizados usando sêmen de lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). Dois minutos após fertilização, os ovos foram submetidos ao choque térmico. **C.** Finalmente foram obtidos animais triploides (3n). **Escala:** 1 cm.

2.3.2 Confirmação da triploidização

A triploidização foi confirmada mediante citometria de fluxo seguindo o protocolo de (XAVIER et al., 2017) (Figura 2). Para tal, os animais foram anestesiados em solução de eugenol (Biodinâmica, Brasil) na concentração de 100 mg/L. Posteriormente, uma pequena parte da nadadeira caudal de cada animal foi coletada e transferidas individualmente para um microtubo de centrífuga de 1,5 mL, contendo 120 µL de solução detergente (9,53 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 47,67 mM de KCl; 15 mM de Tris em pH 8,0, com adição de 74 mM de sacarose e com detergente Triton a 0,6%) por 10 minutos. Os núcleos foram corados adicionando 800 µL de solução de DAPI a 0,01% (4,6 dimidinae 2 phenylidone di-hydrochloride) em D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Sigma #D5773, St. Louis, USA). As amostras foram filtradas em filtros de nylon de 30

µm e analisadas em citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer, Partec, GMBh, Alemanha).

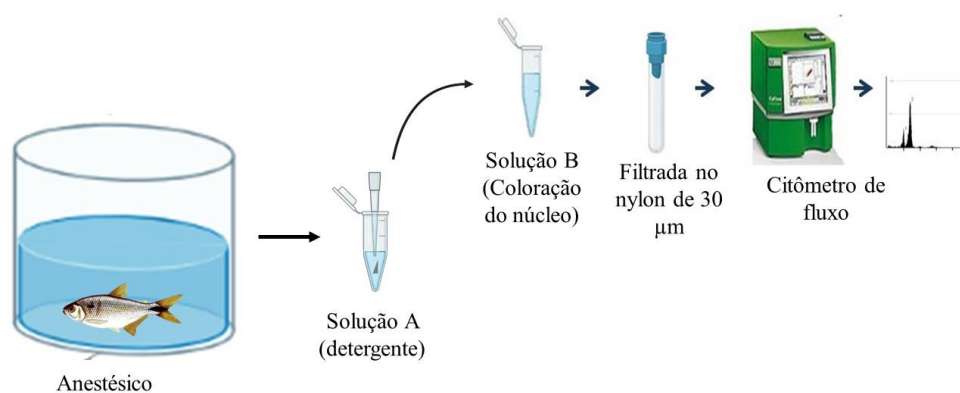


Figura 2. Confirmação da triploidização mediante citometria de fluxo seguindo o protocolo de (Xavier et al., 2017).

2.3.3 Depleção da gametogênese em lambaris juvenis triploides

Diferentemente do experimento 2, os lambaris juvenis triploides, aos 60 dias após a eclosão, apresentavam as características sexuais externas, tornando possível a análise da depleção da gametogênese em grupos distintos, um contendo apenas machos e outro apenas fêmeas. Esta diferença se deve ao fato que os lambaris juvenis diploides foram mantidos em aquários até o início do experimento, enquanto que os lambaris juvenis triploides foram mantidos em tanques de alvenaria e apesar da mesma idade para início do tratamento, a densidade dos animais em cultivo deve ter afetado o desenvolvimento, tornando possível a distinção dos sexos aos 60 dias após a eclosão. Neste experimento foram utilizados 96 machos e 72 fêmeas triploides de lambari (*A. altiparanae*). Os animais foram acondicionados no sistema de recirculação fechado, em aquários de 60 L (n=12), e aclimatados conforme descrito no Experimento 1. O experimento foi composto por grupos: um grupo controle (n=24) mantido a 35°C, e o grupo tratado com busulfan na dosagem de 50 mg/g (n=72 machos e n= 48 fêmeas). Foram administradas três aplicações intraperitoneal de busulfan em cada animal semanalmente. Para a

administração de busulfan, os animais eram anestesiados, utilizando solução de eugenol (Êxodo Científica, Brasil) na concentração de 100 mg/L. O cronograma das etapas de aplicação de busulfan e coleta das gônadas está esquematizado na Figura 4.

2.4 Experimento 4: Produção de híbridos triploides (*Astyanax altiparanae* × *Astyanax fasciatus*)

Neste experimento foi utilizada a associação de duas metodologias de esterilização, a hibridação e a manipulação cromossômica, esse trabalho foi realizado previamente por (PIVA et al., 2018), obtendo resultados de esterilidade completa em machos, apresentado um testículo completamente livre de células germinativas e nas fêmeas apresentando apenas oogônias e oócitos. Portanto, foi realizada a produção de lambari híbridos triploides utilizando os ovos de lambari (*Astyanax altiparanae*) e sêmen lambari de rabo vermelho (*Astyanax fasciatus*) conforme descrito no subtítulo “**2.3.1 Produção de lambaris triploides através da manipulação cromossômica**”. Após 15 dias de eclosão as larvas provenientes da hibridação (*A. altiparanae* × *A. fasciatus*) foram transferidas para caixas com 1.5 m³ (3 × 1 × 0.5) de água, com aeração constante e temperatura controlada (28°C) e mantidos nestas condições até os 10 meses de idade (Figura 3). Os animais foram mantidos nesta condições com a finalidade de obter um desenvolvimento gonadal rápido pois quando os animais são mantidos em aquários a diferenciação externa entre macho e fêmea e o desenvolvimento gonadal é demorado.

A triploidização dos animais foi confirmada por meio de citometria de fluxo conforme ao descrito no subtítulo “**2.3.2 Confirmação da triploidização**”.

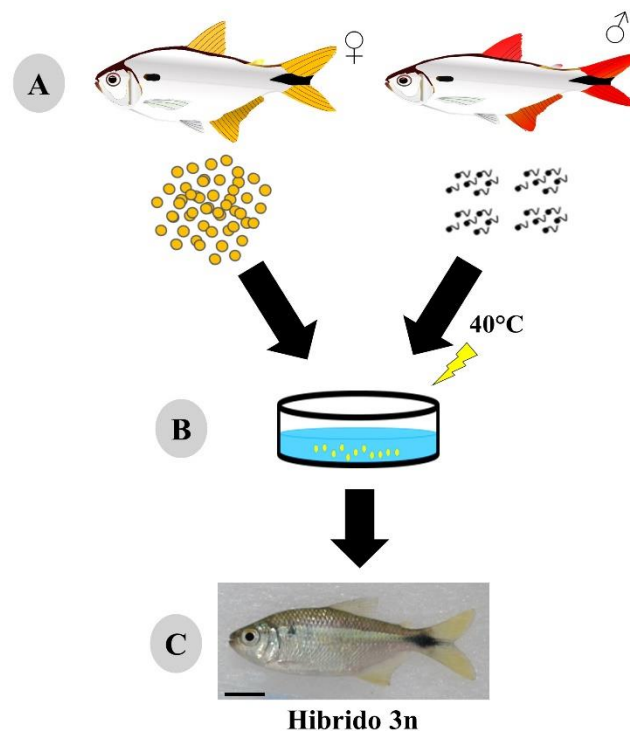


Figura 3. Esquema ilustrativo do processo para obtenção de receptores híbridos triploides através da manipulação cromossômica. **A:** Após indução hormonal os ovos de fêmeas de lambari (*Astyanax altiparanae*) foram coletados **B.** Os ovos foram fertilizados usando sêmen de lambari de rabo vermelho (*Astyanax fasciatus*) para hibridação. Dois minutos após fertilização, os ovos foram submetidos ao choque térmico. **C.** Finalmente foram obtidos animais híbridos triploides. **Escala:** 1 cm.

2.5 Confirmação da depleção da gametogênese por histologia convencional

As gônadas dos lambaris, provenientes dos experimentos 1-3 de esterilização com busulfan, foram coletadas antes de iniciar a primeira aplicação. Estas amostras foram utilizadas como controle do estágio da gametogênese das gônadas dos animais, no início da esterilização química. No experimento 1, foram coletados os testículos de três indivíduos por amostragem ($n=3$) aos 28 (35°C), 38, 58, 78 e 108 dias após o início do experimento. Todas as amostragens foram realizadas com os animais aclimatados na temperatura de 35°C, com exceção da amostragem aos 108 dias que se realizou com os animais aclimatados a 28°C. As gônadas foram fixadas em bouin por 24 horas e depois preservadas em etanol a 70% até o início do processamento das amostras. No experimento 2, foram coletadas gônadas de cada tratamento, sendo coletada duas gônadas de cada tratamento por amostragem ($n=2$), após a segunda e quarta aplicação de busulfan. As

gônadas foram fixadas em bouin por 24 horas e mantidas em etanol a 70% até o início do processamento das amostras. No experimento 3, as gônadas (n= 2) de cada tratamento foram coletados após a segunda e terceira aplicação de busulfan, e um mês após finalizar o tratamento com busulfan. Nos híbridos adultos triploides foram coletadas gônadas (n= 2) após 10 meses de idade. As gônadas foram fixadas em bouin por 24 horas e mantidas em etanol a 70% até o início do processamento das amostras. O cronograma de coleta das gônadas está esquematizado na Figura 4.

As amostras dos quatro experimentos foram processadas por histologia convencional. Inicialmente as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clareadas em xilol (Êxodo Científica #X09738RA, Sumaré, Brasil) e incluídas em paraplast (Sigma # SLBS8607, St. Louis, USA). Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo (Leica Biosystems #RM2235, Heidelberg, Germany) com 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e eosina, analisadas por microscopia óptica (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e fotografadas com o uso de uma câmera fotográfica (Nikon DSRi2, Nikon, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio. Para avaliar a depleção da gametogênese em cada tratamento, o índice gonadossomático (IGS) foi calculado, utilizando a fórmula $IGS = PG / PT \times 100$, onde PG é o peso da gônada e PT é o peso total dos peixes.

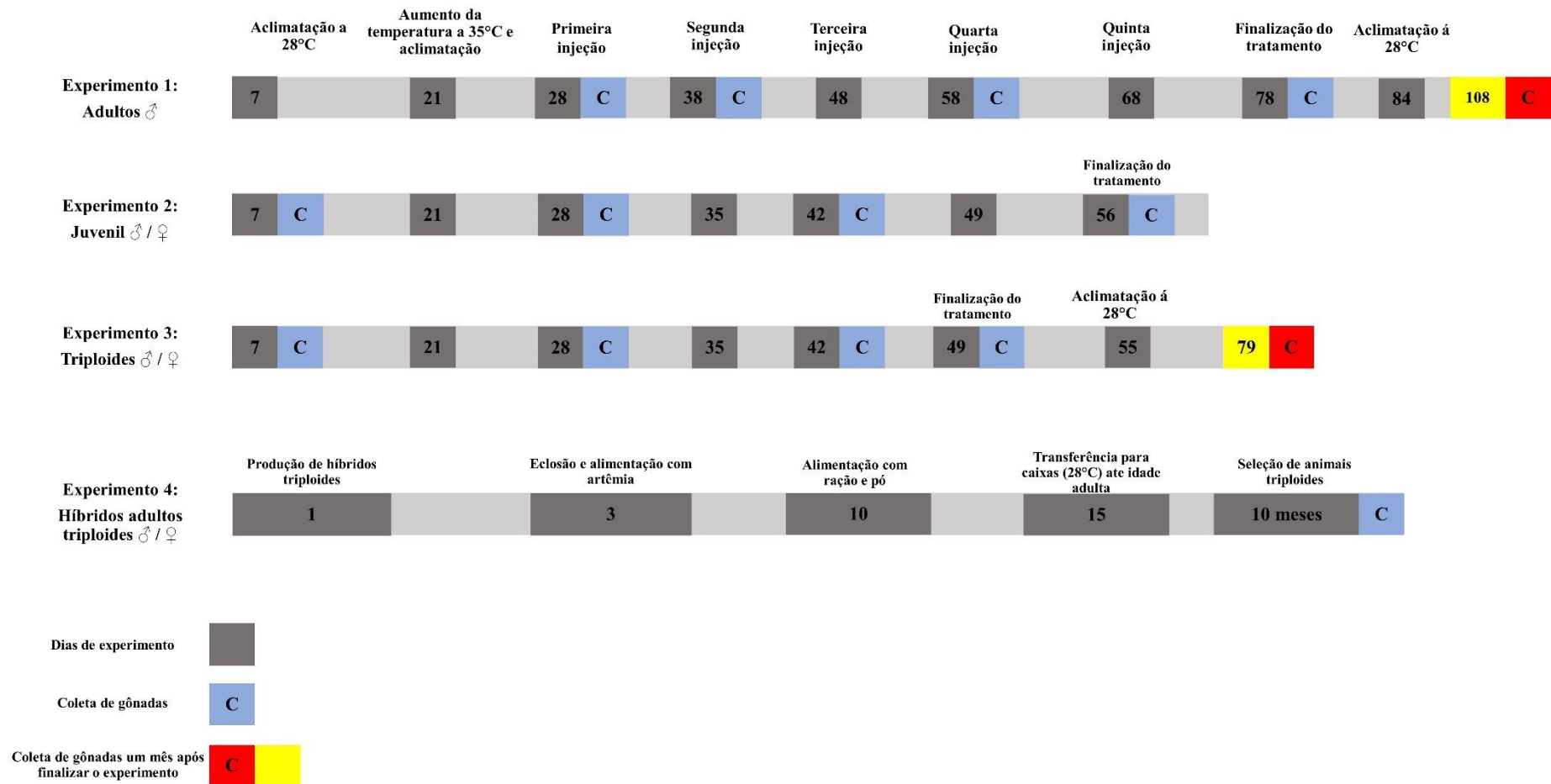


Figura 4. Cronograma das etapas de aplicação de busulfan e coleta de gônada dos três experimentos realizados. No experimento 1, as aplicações de busulfan foram realizadas com intervalo de 10 dias entre cada uma delas. No experimento 2 e 3, as aplicações de busulfan foram realizadas semanalmente. Os animais coletados não recebiam a aplicação de busulfan no dia de aplicação. No experimento 4 os peixes foram mantidos até os 10 meses de idade, os animais triploides foram selecionados e as gônadas foram coletadas para confirmação de esterilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1: Depleção da espermatogênese em lambaris diploides adultos

3.1.1. Análise de GSI e características morfológicas externas dos testículos

Nas análises estatísticas das avaliações de GSI entre os tratamentos C15, C40, B15 e B40 não foram observadas diferenças significativas (Figura 5). Nas análises das características morfológicas externas dos testículos dos grupos controles (C15 e C40), os testículos foram tornando-se mais translúcidos visualmente, após a aclimação na temperatura de 35°C, comparando os testículos coletados aos 28 (Figuras 6A-6B) e 78 dias (Figuras 6E-6F) do experimento, coincidindo com a primeira e após quinta aplicação de busulfan. Esta observação sugere que a temperatura per si é capaz de interferir na espermatogênese, mas não reduz os testículos em lambaris diploides adultos.

Após o período de diminuição da temperatura e aclimação a 28°C, aos 108 dias de experimento, os testículos dos grupos controles retornaram à coloração esbranquiçada, sugerindo o retorno da espermatogênese (Figura 6I-J). Nos grupos tratados com busulfan (B15 e B40), os testículos coletados aos 28 dias de experimentos, início do tratamento busulfan, apresentavam-se com as mesmas morfologias externas dos grupos controles, bem desenvolvidos e com coloração esbranquiçada (Figuras 6C-6D). Aos 78 dias do experimento, após a quinta aplicação de busulfan, os grupos tratados com busulfan (B15 e B40), diferentemente dos grupos controles, apresentavam os testículos translúcidos e regredidos (Figura 6G-6H) em relação ao início do tratamento com busulfan (Figuras 6C-6D), sendo visualmente observada uma regressão mais acentuada no grupo B40 (Figura 6H) em relação ao grupo B15 (Figura 6G).

Estes dados indicam a ação do busulfan na regressão dos testículos, a qual não é observada na ação apenas da temperatura. Aos 108 dias de experimento, 30 dias após o

término do tratamento com busulfan e já aclimatados a 28°C, os testículos dos indivíduos dos grupos B15 e B40 não apresentavam mais o aspecto de gônadas regredidas, como nas Figuras (6G-6H), sendo observado partes translúcidas e amarelas nos testículos (Figura 6K-6L). Este resultado sugere o retorno da espermatogênese em ambos os grupos tratados com busulfan.

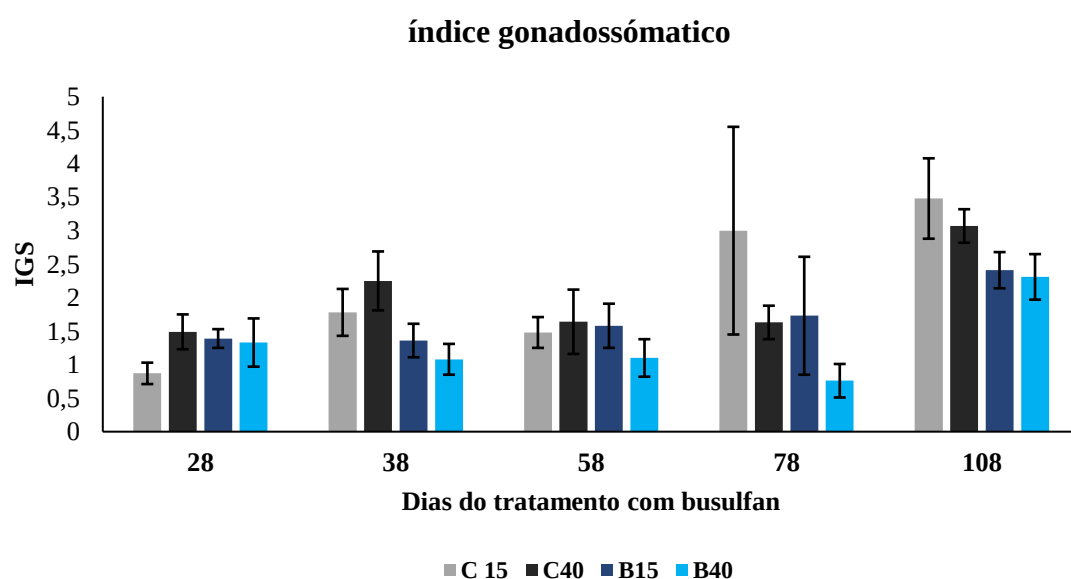


Figura 5. Efeito do tratamento com busulfan associado a temperatura alta sobre o índice gonadossômático em machos adultos diploides de lambaris de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). Nas análises estatísticas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Os dados foram descritos como média $\pm$ erro padrão.

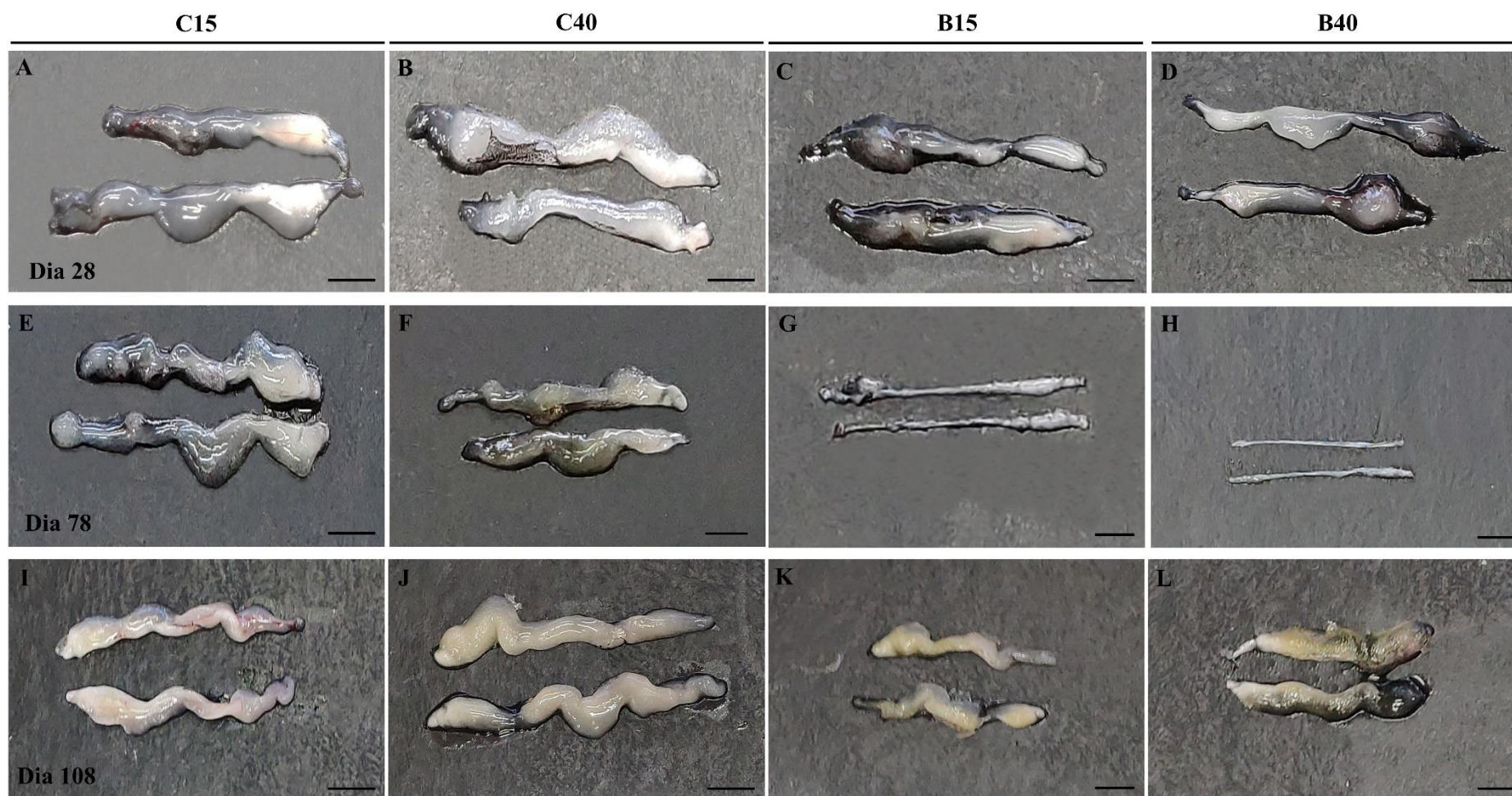
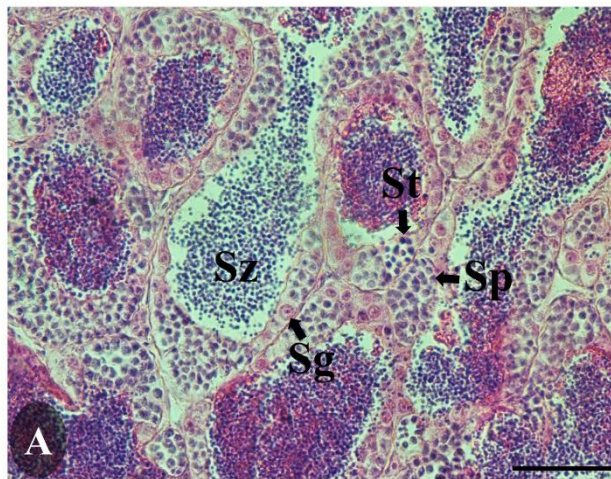


Figura 6. Imagem representativa dos aspectos visuais de coloração, redução e crescimento dos testículos de lambaris (*Astyanax altiparane*), ao longo do experimento nos diferentes dias de coletas, anterior ao início, durante o tratamento e após o término do tratamento com busulfan para todos os grupos (C15, C40, B15 e B40). Os testículos dos quatro tratamentos apresentaram um aspecto translúcido durante o período de aclimação a 35°C (**A, B, C, D**). Depois de cinco aplicações de busulfan (dia 78), foi observado uma redução dos testículos nos tratamentos com busulfan B15 (**E**) e B40 (**F**), quando comparados com os grupos controle C15 (**G**) e C40 (**H**). Um mês após finalizar o experimento (dia 108), nos grupos tratados com busulfan (**K-L**), percebe-se a aparência dos testículos similar aos grupos controles (**I-J**), indicando o retorno da espermatogênese. **Escala:** 0,5 cm.

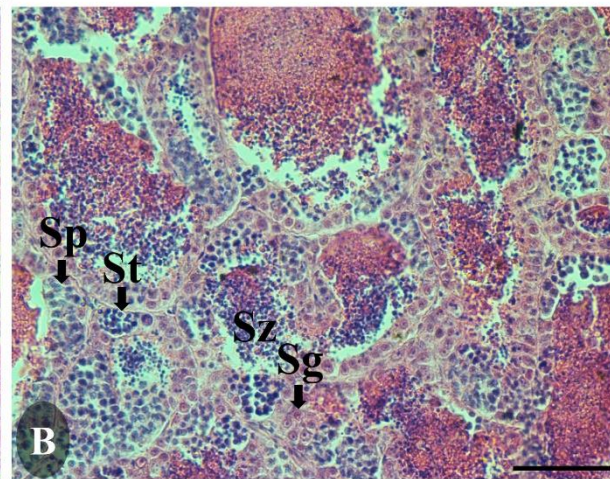
3.1.2. Efeitos do busulfan e da alta temperatura nos testículos

Os testículos dos animais coletados no vigésimo oitavo dia do experimento, anterior a primeira aplicação de busulfan, apresentavam espermatogênese ativa, observado no epitélio germinativo a presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides no lúmen testicular (Figura 7A-D). No dia 38 do experimento (dia da segunda aplicação de busulfan), nos grupos controles (C15 e C40) foram visualizadas espermatogônias, espermatócitos, espermátides no epitélio germinativo e alguns espermatozoides sendo reabsorvidos no lúmen testicular (Fig 8A-B). A quase ausência de espermatozoides pode estar relacionado o aspecto translúcido do testículo, quando analisada a característica morfológica externa. No grupo B15, algumas espermatogônias, espermatócitos e células com núcleo picnótico foram observadas no epitélio germinativo (Figura 8C), indicando depleção da espermatogênese nos testículos pela ação do busulfan. No grupo B40, alguns espermatócitos e células com núcleo picnótico foram observados no epitélio germinativo, bem como uma degeneração do epitélio germinativo e aumento da área do lúmen testicular (Figura 8D). A ausência de espermatogônias no grupo B40, sugere maior efeito da dosagem de busulfan, em relação ao grupo B15, na depleção da espermatogênese.

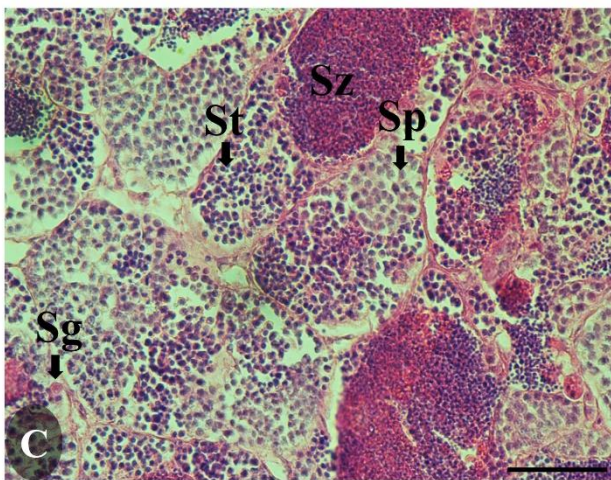
C15



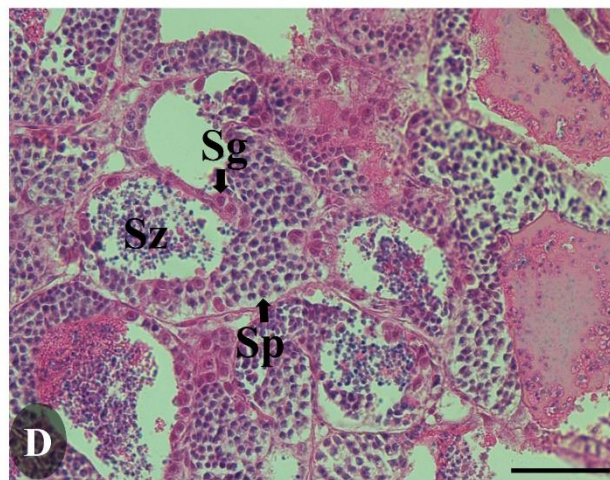
C40



B15

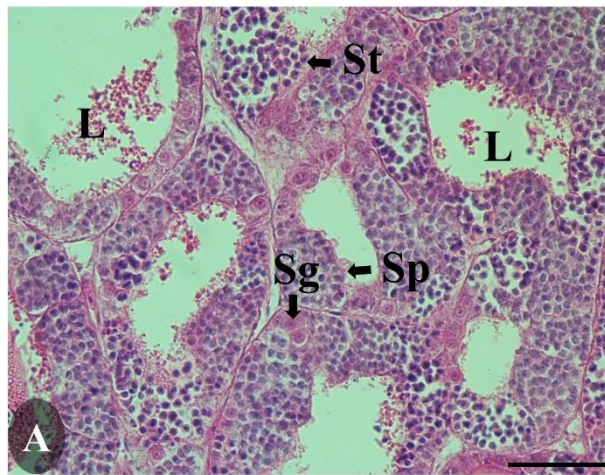


B40

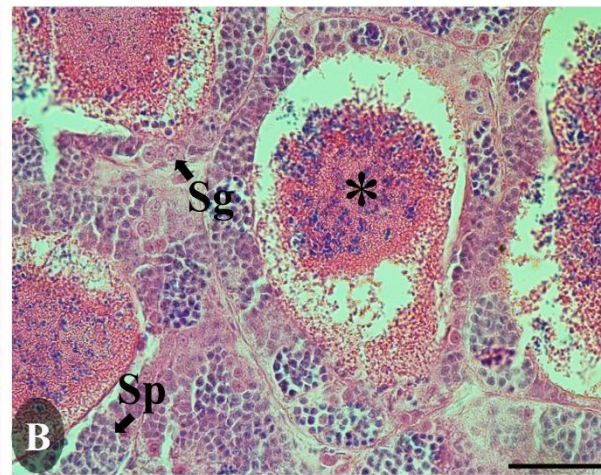


Dia 28

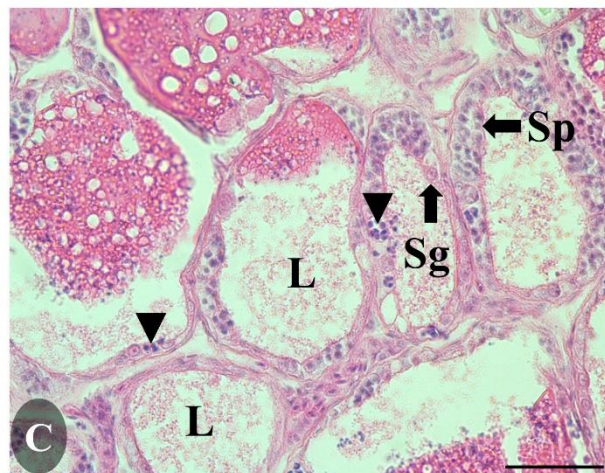
C15



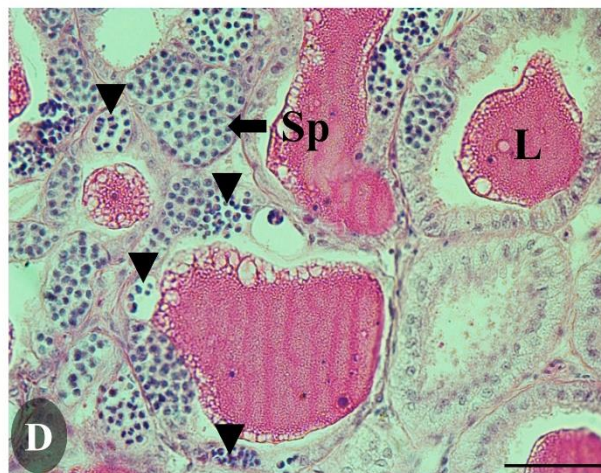
C40



B15



B40



Dia 38

Figura 7. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) diploide, provenientes dos grupos controles e dos grupos tratados com busulfan, aos 28 dias do experimento. **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15, **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides. **Escala:** A-D: 100 µm.

Figura 8. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides, provenientes dos grupos controles e dos grupos tratados com busulfan, aos 38 dias do experimento. **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15 e **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; Cabeça da seta: Núcleo de célula picnótica; Asterisco: Espermatozoides sendo reabsorvidos. **Escala:** A-D: 50 µm.

No dia 58 do experimento, data da quarta aplicação de busulfan, os grupos controles (C15 e C40) apresentavam espermatogônias, espermatócitos e espermátides no epitélio germinativo. Em algumas áreas dos testículos foram observadas a reabsorção de espermatozoides no lúmen testicular (Figura 9A-9B), possivelmente pelo efeito da temperatura. No tratamento B15, a supressão da espermatogênese foi quase completa, observando-se de maneira dispersas, algumas espermatogônias e espermatócitos no epitélio germinativo e grandes áreas de lúmen testicular livre de espermatozoides (Figura 9C). No grupo B40, foi observado nos testículos apenas a presença de lúmen testicular e de interstício (Figura 9D), indicando a completa depleção da espermatogênese.

No dia 78 do experimento, após a quinta aplicação de busulfan e início da diminuição da temperatura para 28°C, o grupo controle C15 já apresentava o retorno do processo de espermatogênese, sendo observado nos testículos a presença de células da linhagem germinativa no epitélio germinativo e espermatozoides no lúmen testicular (Figura 10A). No grupo C40, foram observados a presença de espermatócitos e espermátides nos testículos (Figura 10B). No grupo B15, alguns espermatócitos e espermátides dispersas foram encontrados nos testículos, e em alguns indivíduos, apenas apresentavam o lúmen testicular (Figura 10C). No grupo B40, a depleção da espermatogênese foi completa, observando-se apenas lúmen testicular (Figura 10D),

sugerindo que a aplicação da dosagem de 40 mg/g de busulfan parece ser mais eficiente que a de 15 mg/g, para a depleção completa da espermatogênese em lambaris.

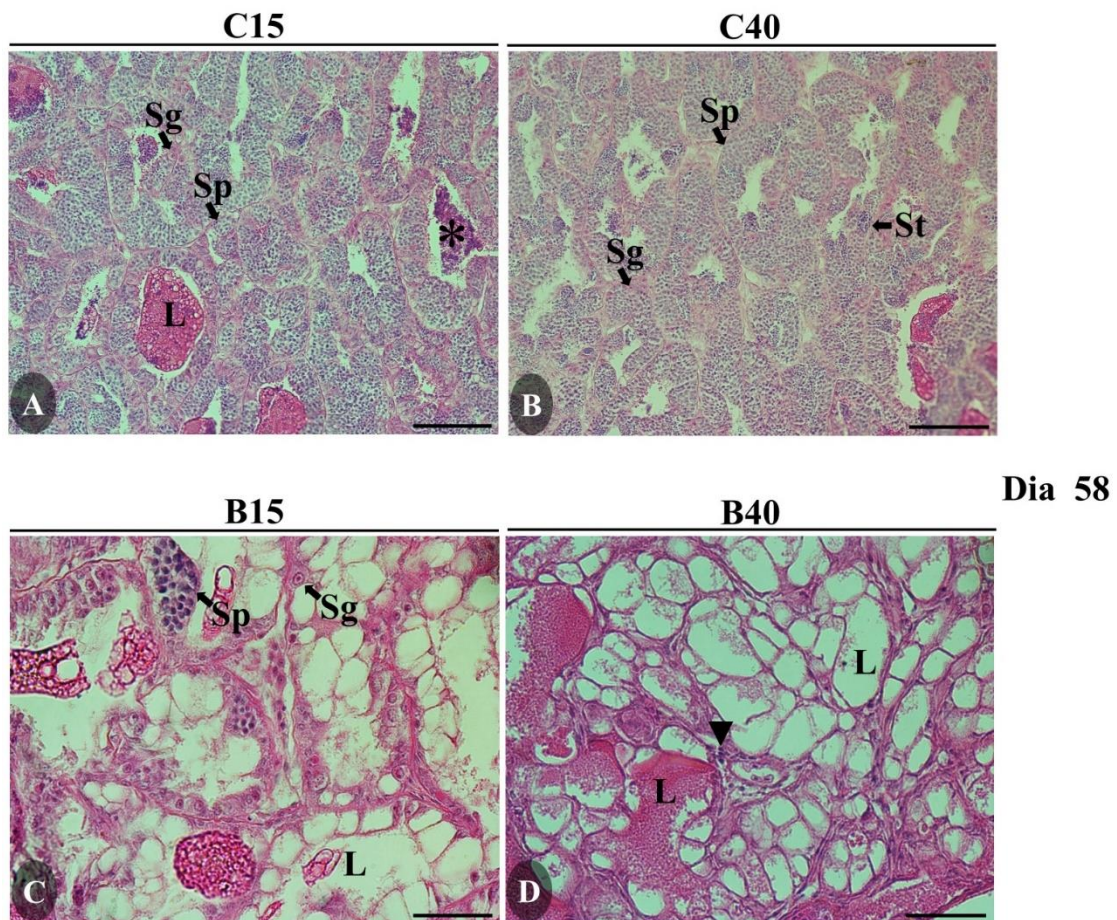


Figura 9. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides, aos 58 dias do experimento (quarta aplicação de busulfan). **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15 e **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônia; Sp: Espermatócitos; St: Espermatídes; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; Cabeça da seta: Núcleo de célula picnótica; Asterisco: Espermatozoides sendo reabsorvidos. **Escala:** A, B: 100 μ m; C-D: 50 μ m.

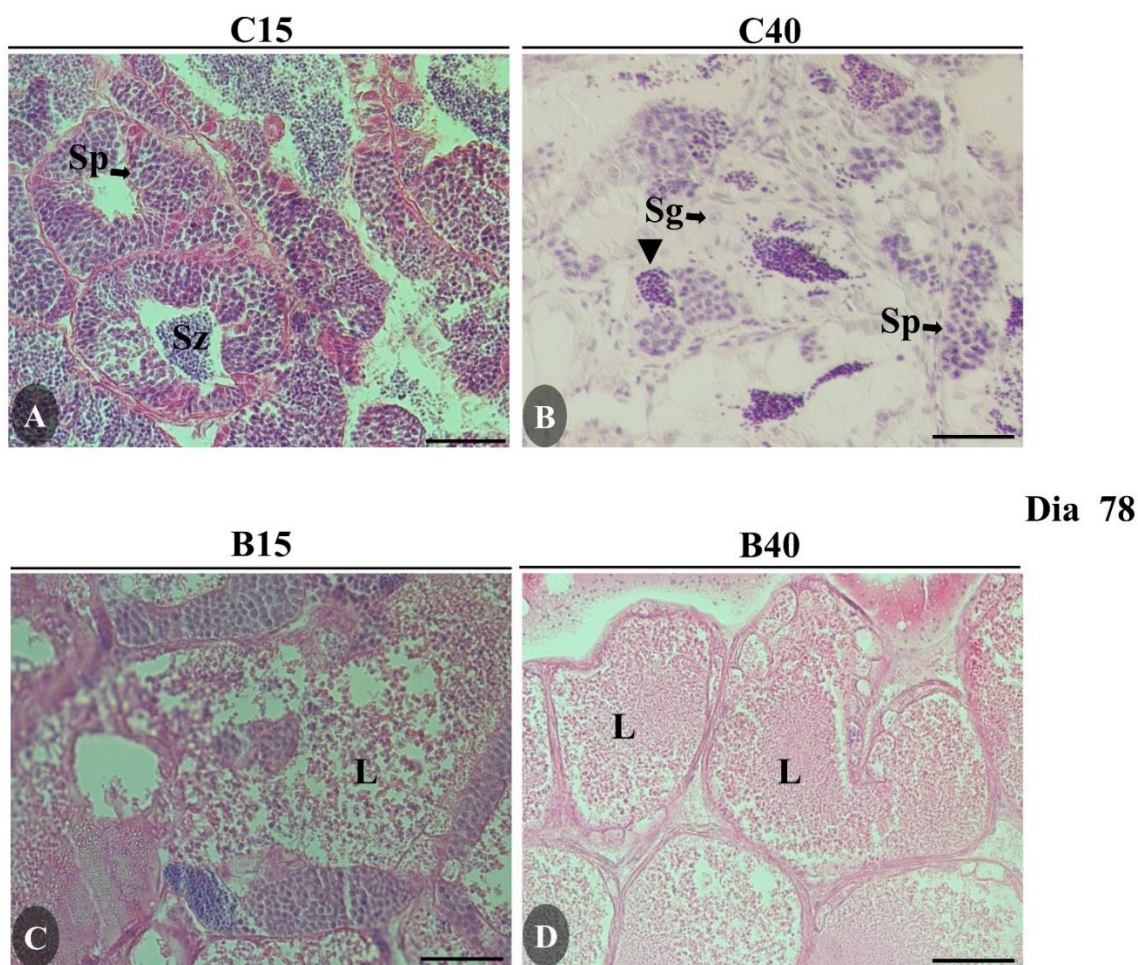


Figura 10. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides, aos 78 dias do experimento, término do tratamento de busulfan. **A:** Grupo C15, **B:** Grupo C40, **C:** Grupo B15 e **D:** Grupo B40. Sg: Espermatogônia; Sp: Espermatócitos; St: Espermatídes; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; Cabeça da seta: Núcleo de célula picnótica; Asterisco: Espermatozoides sendo reabsorvidos. **Escala:** A, B: 100 μ m; C-D: 50 μ m.

No dia 108 do experimento, um mês após o término do tratamento com busulfan, com os animais aclimatados a 28°C, os testículos dos grupos controles C15 e C40 apresentavam espermatogênese ativa, apresentando todas as células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes no epitélio germinativo e espermatozoides no lúmen testicular) (Figura 11A-B). No grupo B15, notou-se a presença de algumas espermatogônias de maneira isolada (Figura 11C), em alguns indivíduos na parte cranial dos testículos, foram observadas apenas algumas espermatogônias e espermatídes no epitélio germinativo e alguns espermatozoides no lúmen testicular (Figura 11D) sugerindo o retorno da espermatogênese. No grupo B40, foram observadas

algumas espermatogônias e espermátides no epitélio germinativo e espermatozoides no lúmen testicular (Figura 11E). Alguns indivíduos ainda apresentavam depleção da espermatogênese completa (Figura 11F), sugerindo que a maior concentração de busulfan utilizada prolonga o retorno da espermatogênese.

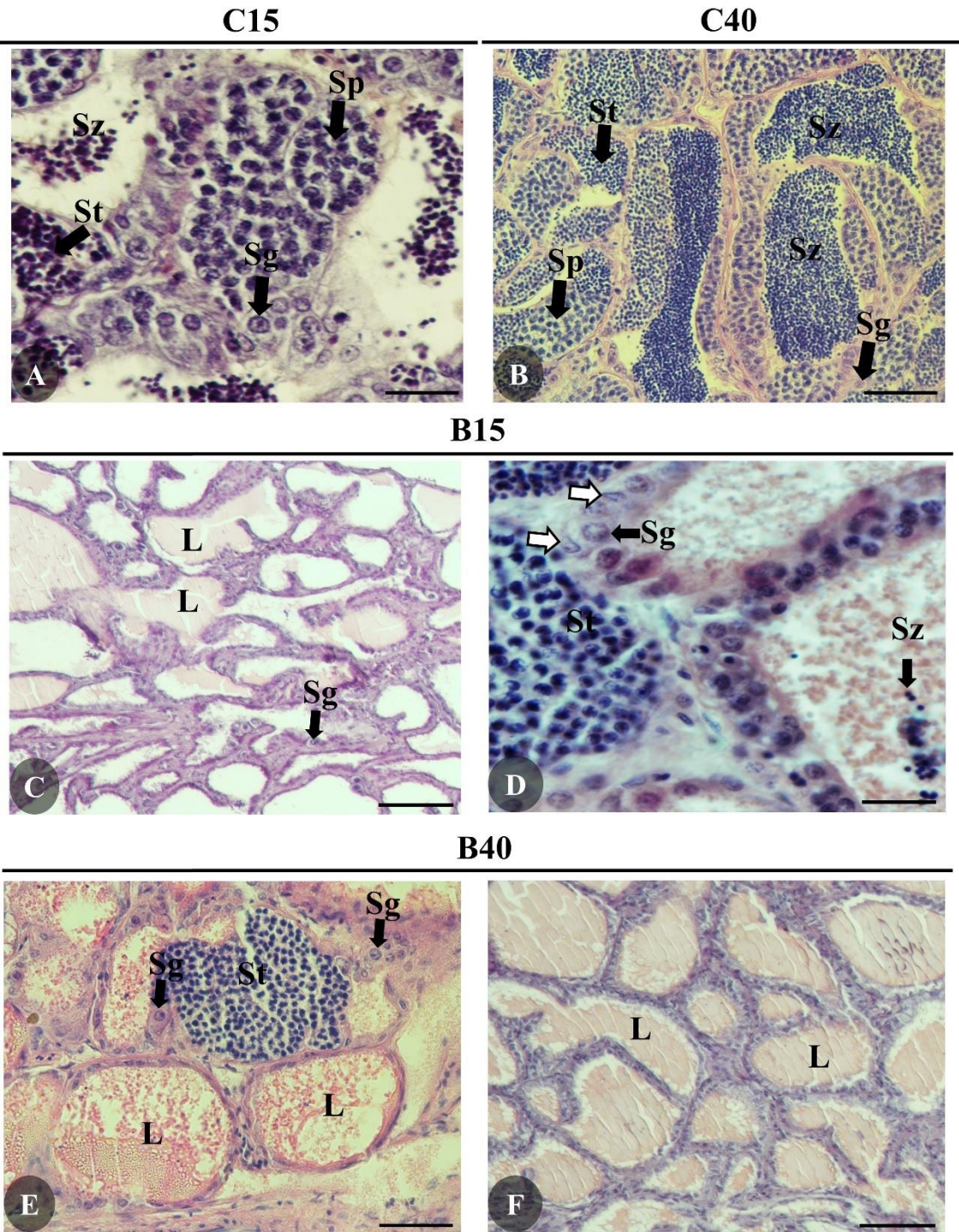


Figura 11. Testículos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides aos 108 dias do experimento, após um mês de finalizado o tratamento com busulfan. **A:** Controle C15; **B:** Controle C40; **C-D:** Grupo busulfan B15; **E-F:** Grupo busulfan B40. Sg: Espermatogônia; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; setas brancas com contorno preto: células de Sertoli. **Escala:** A-F: 50 µm.

3.2. Experimento 2: Depleção da gametogênese em lambaris juvenis diploides

Neste experimento, machos e fêmeas eram coletados ao acaso, uma vez que os animais ainda não apresentavam características morfológicas sexuais externas, impossibilitando a escolha do sexo nas análises.

Antes da primeira aplicação de busulfan no vigésimo oitavo dia do experimento (coleta 1), os testículos de cada grupo, analisados por histologia convencional, apresentavam todas as células da linhagem germinativa no epitélio germinativo, tais como espermatogônias, espermatócitos e espermátides, bem como espermatozoides no lúmen testicular (Figura 12A, 12C e 12E). Apenas no testículo do indivíduo da (Figura 12D) não foi observado espermatozoides. Também foi verificado nos testículos a presença de células com núcleo picnótico em alguns testículos coletados (Figura 12A e 12E). Apenas uma fêmea foi coletada nesta etapa do experimento, o ovário estava em desenvolvimento inicial, visualizando-se as lamelas ovígeras, contendo oócitos primários e células de tecido conjuntivo (Figura 12B).

Aos 42 dias do experimento, no dia da aplicação da terceira dose de busulfan, foram coletadas gônadas de dois juvenis do grupo controle, sendo uma correspondente a macho e uma outra a fêmea. No testículo foi verificado a presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e células com núcleo picnótico (Figura 13A). No ovário, foi observada uma regressão do ovário e as lamelas ovígeras apresentando indícios de atrofia lamelar, contendo oócitos primários e oócitos em atresia. Também foi observado um aumento de células do tecido conjuntivo (Figura 13B). Estas características observadas sugerem um efeito da temperatura no processo de oogênese em juvenis. No

grupo B40, foram coletadas gônadas de duas fêmeas, ambas apresentavam redução do ovário, sendo observado oogônias e oócitos primários nas lamelas ovígeras, as quais apresentavam também uma leve atrofia lamelar (Figura 13C). No grupo B50, dois machos foram coletados, observando-se depleção completa da espermatogênese, sendo verificado visualizado nos testículos apenas interstício e lúmen testicular (Figura 13D). Apesar deste grupo ter uma concentração maior de busulfan que o grupo B40, os resultados indicam que busulfan é mais agressivo na espermatogênese que oogênese, uma vez que os ovários no grupo B40 estavam com características similares ao do grupo controle. No grupo B60, um macho e uma fêmea foram coletados, sendo observado no testículo a presença de espermatogônias, células com núcleo picnótico e o lúmen testicular sem a presença de espermatozoides (Figura 13E). No ovário, as lamelas ovígeras estavam em processo de atresia lamelar, apresentando alguns oócitos primários. O ovário apresentava também abundante tecido conjuntivo (Figura 13F).

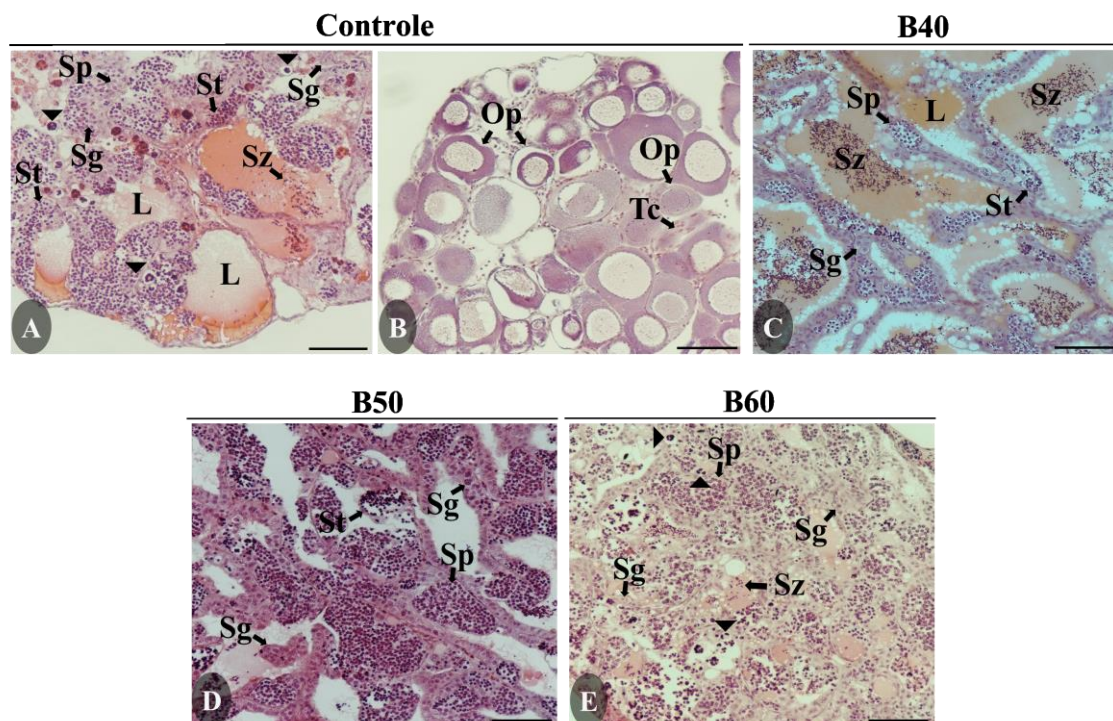
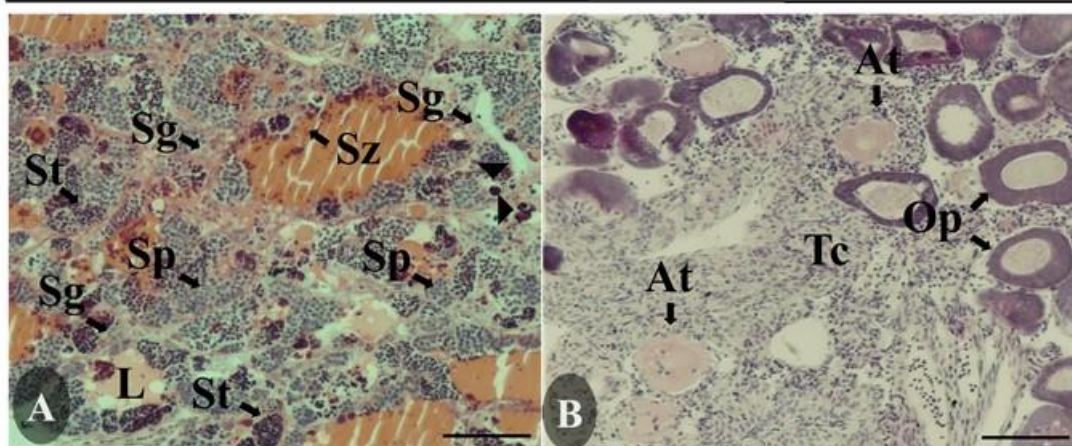
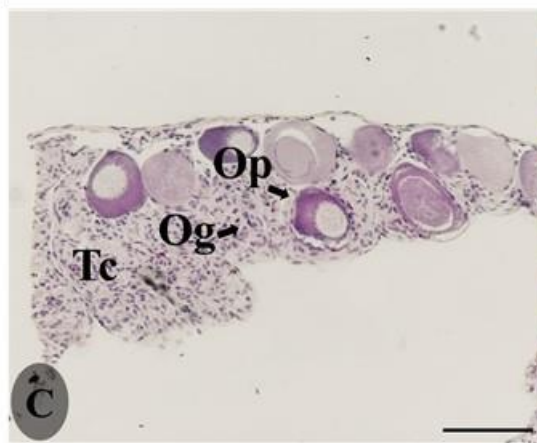


Figura 12. Gônadas de lambaris (*Astyanax altiparanae*) juvenis diploides, coletadas aos 28 dias do experimento, antes de iniciar o tratamento com busulfan. **A, C, D, E:** Testículos. **B:** Ovário. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermatídes; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; cabeça da seta: núcleo de célula picnótica; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** A-E: 200 µm.

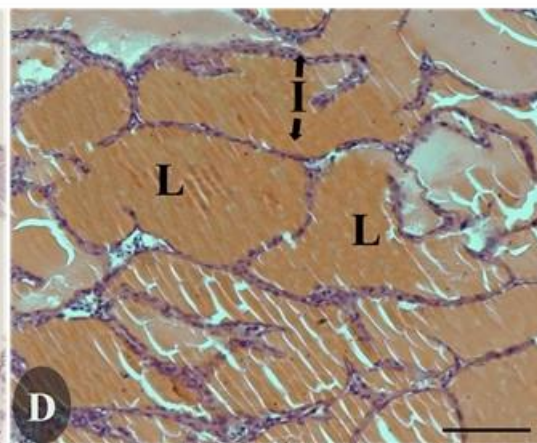
Controle



B40



B50



B60

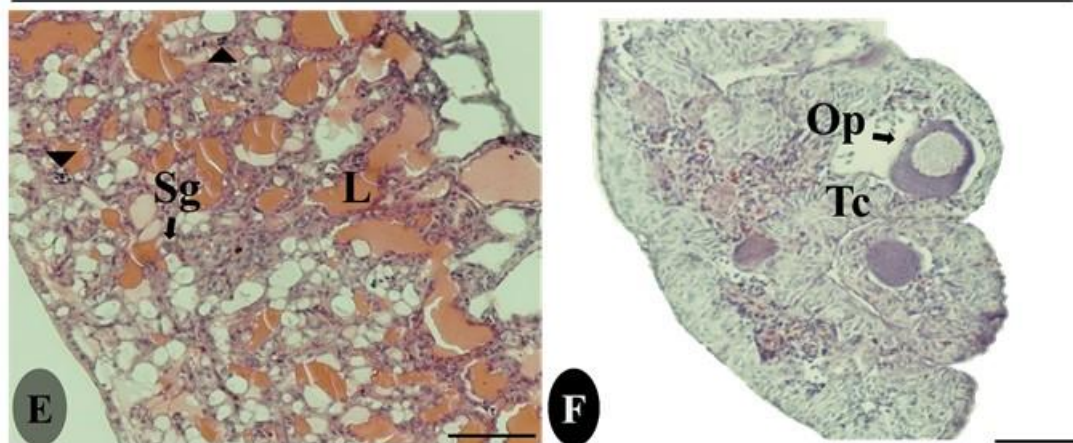


Figura 13. Gônadas de lambaris (*Astyanax altiparanae*) juvenis diploides, aos 42 dias do experimento, na data da terceira aplicação de busulfan. **A:** Testículo de indivíduo do grupo controle; **B:** Ovário de indivíduo do grupo controle; **C:** Ovário de indivíduo do grupo B40. **D:** Testículo de indivíduo do grupo B50; **E:** Testículo de indivíduo do grupo B60; **F:** Ovário de indivíduo do grupo B60. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; I: interstício; cabeça da seta: núcleo de célula picnótica; Op: oócito primário; Op: oócito atresico; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** A-F: 200 μ m.

Aos 56 dias do experimento, após a quarta aplicação de busulfan e início da diminuição da temperatura para 28°C, foram coletadas gônadas de um macho e uma fêmea do grupo controle. No testículo foi verificado que a espermatogênese se encontrava ativa, sendo identificado espermatogônias, espermátocitos e espermátides no epitélio germinativo e alguns espermatozoides no lúmen testicular (Figura 14A). No ovário foi visualizada uma redução e as lamelas ovígeras estavam atrofiadas, predominando no ovário tecido conjuntivo e alguns oócitos isolados (Figura 14B). Não foram coletadas gônadas do grupo B40, uma vez que os animais deste grupo vieram a óbito poucos dias antes de finalizar o experimento. No grupo B50, foram coletadas apenas amostras de machos, sendo observada a depleção completa da espermatogênese. Os testículos continham apenas interstício e lúmen testicular (Figura 14C). No grupo B60, apenas gônadas de fêmeas foram coletadas, sendo observado redução do ovário, predominando no ovário células do tecido conjuntivo, lamelas ovígeras atrofiadas, e alguns oócitos primários isolados (Figura 14D).

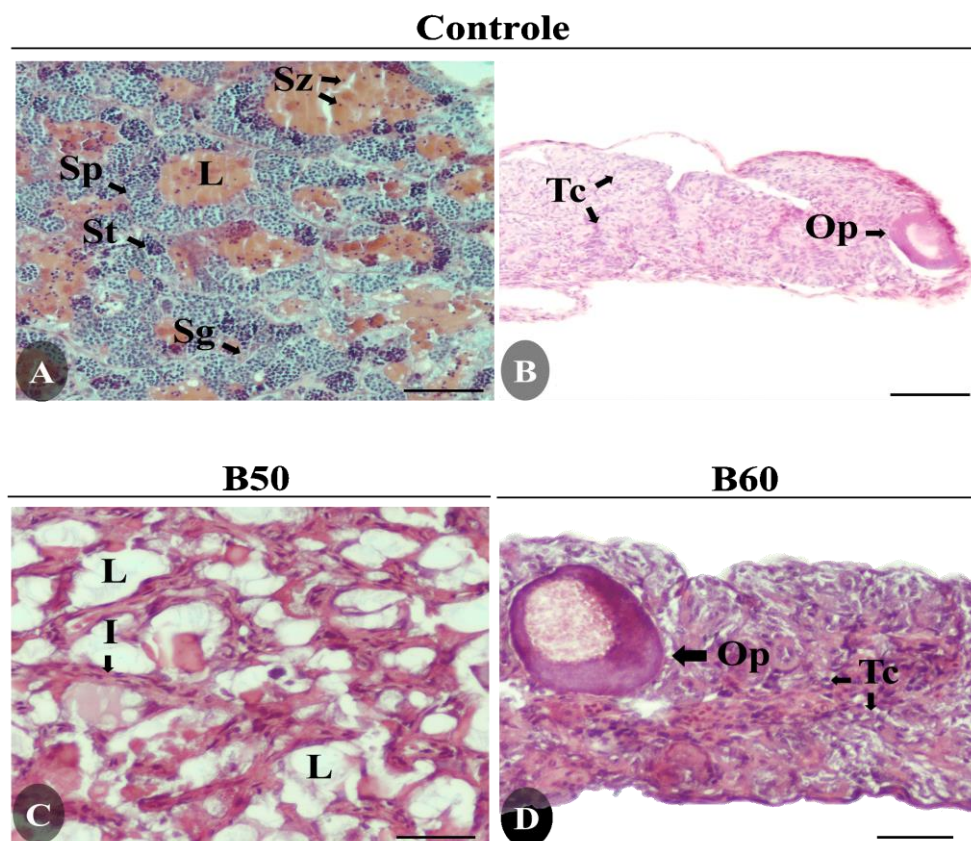


Figura 14. Gônadas de lambaris (*Astyanax altiparanae*) juvenis diploides, aos 56 dias do experimento, depois de finalizar o tratamento com busulfan. **A:** Testículos de indivíduos do grupo controle; **B:** Ovário de indivíduo do grupo controle; **C:** Testículo de indivíduo do grupo B50; **D:** Ovário de indivíduo do grupo B60. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermatócitos; St: Espermátides; Sz: Espermatozoides; L: Lúmen testicular; I: interstício; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** A-D: 200 μ m.

3.3. Experimento 3: Depleção da gametogênese em lambaris juvenis triploides

As análises de GSI e das características morfológicas externas visuais foram realizadas utilizando apenas lambaris juvenis triploides machos, enquanto que as análises histológicas das gônadas foram realizadas em machos e fêmeas. Esta última etapa foi possível de ser realizada, uma vez que nos lambaris juvenis triploides pôde ser visualizadas características sexuais externas e dividir grupos de machos e fêmeas, diferentemente dos lambaris juvenis diploides, os quais não apresentavam estas características.

3.3.1. Análise de GSI e características morfológicas externas dos testículos

Nas análises de GSI e características morfológicas externas das gônadas foram utilizados apenas indivíduos juvenis triploides machos. Aos 28 dias do experimento, na data da primeira aplicação de busulfan, foram coletados apenas animais do grupo controle. Os testículos coletados apresentavam coloração amarela-translúcida (Figura 15A) e 2.39 ± 0.18 de IGS. Aos 42 dias do experimento, na data da terceira aplicação de busulfan, os testículos coletados do grupo controle tinham aparência translúcida em algumas partes (Figura 15B) com IGS de 2.50 ± 0.19 . No grupo tratado com busulfan, os testículos eram todos translúcida (Figura 15C), apresentando redução no tamanho e do IGS (1.11 ± 0.37) (Figura 16).

Aos 49 dias do experimento, no final do tratamento com busulfan, após terceira dose, os testículos dos indivíduos coletados no grupo controle apresentaram coloração esbranquiçada, mais acentuada que aquelas do grupo controle aos 42 dias do experimento

(Figura 15D) e um aumento do IGS (3.17 ± 0.97) (Figura 16). Nesta coleta, no grupo tratado com busulfan, os testículos eram totalmente translúcidos (Figura 15E) e o IGS apresentou o menor valor calculado entre as coletas avaliadas 0.79 ± 0.04) (Figura 16). Aos 79 dias do experimento, 30 dias após a última aplicação de busulfan, foram realizadas coletas de testículos de indivíduos do grupo controle, sendo observada partes com coloração amareladas e aumento no tamanho do testículo (4.13 ± 0.27 IGS) (Figura 15F). No grupo tratado com busulfan, os testículos apresentavam na parte anterior aspectos translúcidos e na região posterior, coloração esbranquiçada (Figura 15G). Em ambos grupos foi observado o aumento no IGS (1.82 ± 0.21), sendo menor no grupo tratado com busulfan (Figura 16).

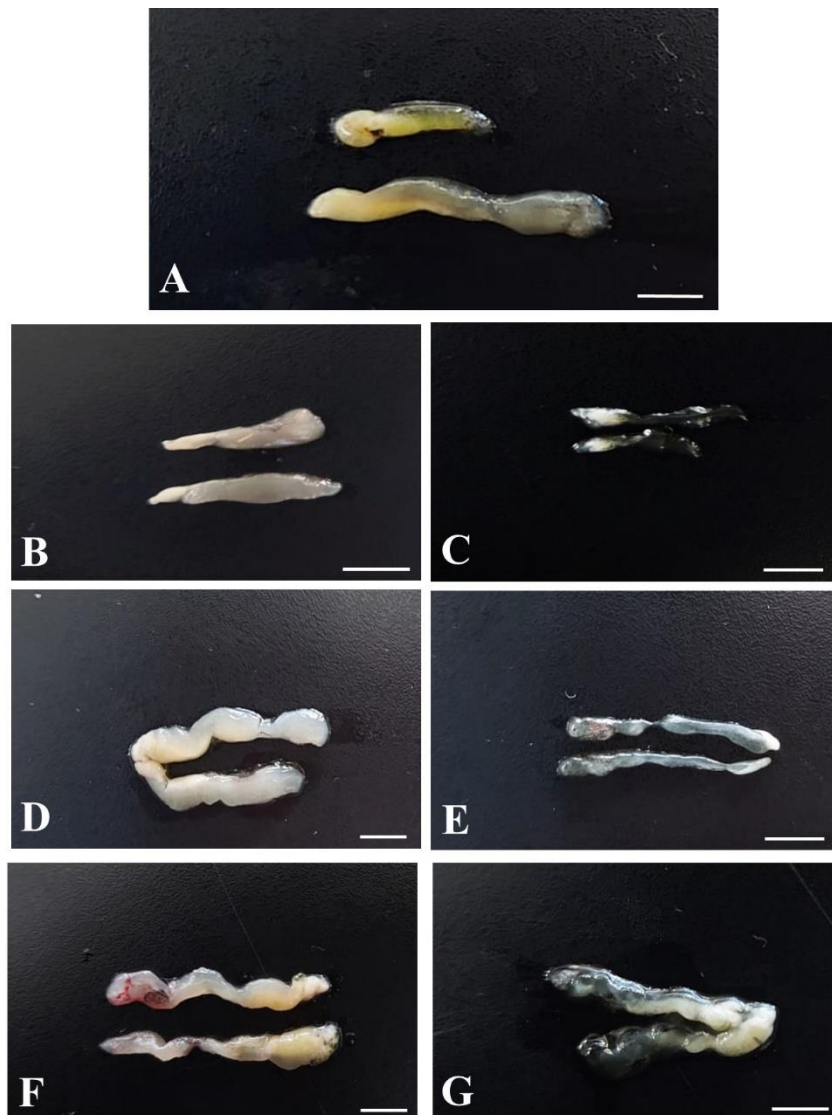


Figura 15. Análise das características morfológicas externas dos testículos de lambaris juvenis triploides, vindas do dia 28 (antes da primeira aplicação de busulfan) e dos grupos controle e tratamento com busulfan, aos 42, 49 e 79 dias do experimento. **A:** antes da primeira aplicação de busulfan; **B:** testículo de indivíduo do grupo controle aos 42 dias do experimento; **C:** testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan aos 42 dias do experimento; **D:** testículo de indivíduo do grupo controle aos 49 dias do experimento; **E:** testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan aos 49 dias do experimento; **F:** testículo de indivíduo do grupo controle aos 79 dias do experimento; **G:** testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan aos 79 dias do experimento. **Escala:** 0.5 cm.

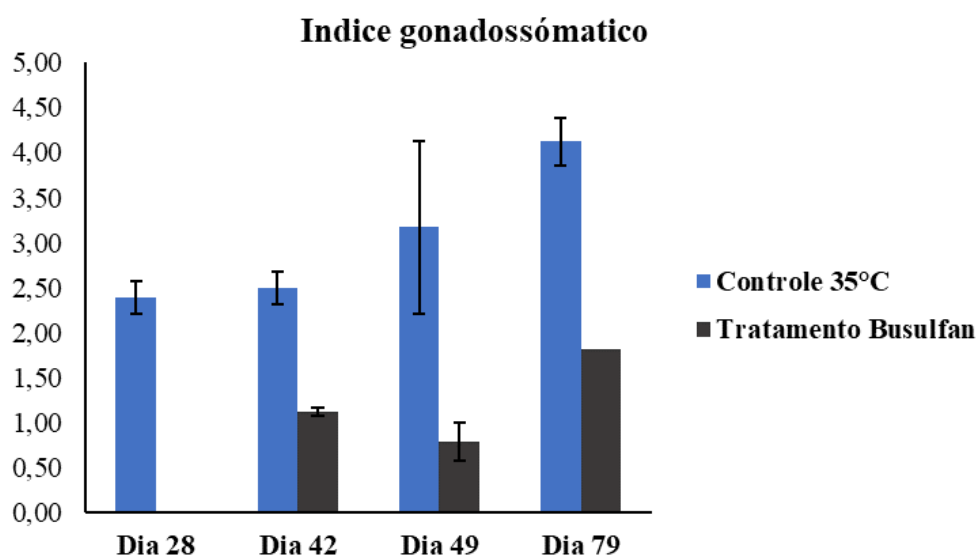


Figura 16. Efeito do tratamento com busulfan em temperatura alta sobre o índice gonadossômático em machos de lambaris juvenis triploides. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão.

3.3.2. Análises das características morfológicas dos testículos através de histologia convencional

Nos testículos coletados de (n= 2) indivíduos do grupo controle, aos 7 dias e 28 dias do experimento que corresponde a etapa de aclimação a 28°C e 35°C respectivamente, foram observadas espermatogônias e espermatócitos, células de sertoli e células com núcleo picnótico no epitélio germinativo (Figura 17A-B).

Aos 42 dias do experimento, na data da terceira aplicação de busulfan, foram coletados dois indivíduos machos do grupo controle, sendo observados nos testículos a presença de espermatócitos em algumas partes, células com núcleo picnótico e o lúmen

testicular estava desprovido de espermatozoides (Figura 18A). Para o grupo tratado com busulfan foram coletados dois machos e os testículos apresentavam a depleção completa das células germinativas, observando-se células do interstício e lúmen testicular livre de espermatozoides (Figura 18B e 18C). Aos 49 dias do experimento, data do término do tratamento com busulfan e após a terceira aplicação de busulfan, os testículos provenientes de dois machos do grupo controle ainda apresentavam espermátócitos em algumas partes e células com núcleo picnótico. No entanto, o lúmen testicular se encontrava desprovido de espermatozoides (Figura 19A). No grupo tratado com busulfan, os testículos coletados estavam completamente desprovidos de células germinativas e espermatozoides, observando-se unicamente lúmen testicular e interstício (Figura 19B e 19C).

28°C

35°C

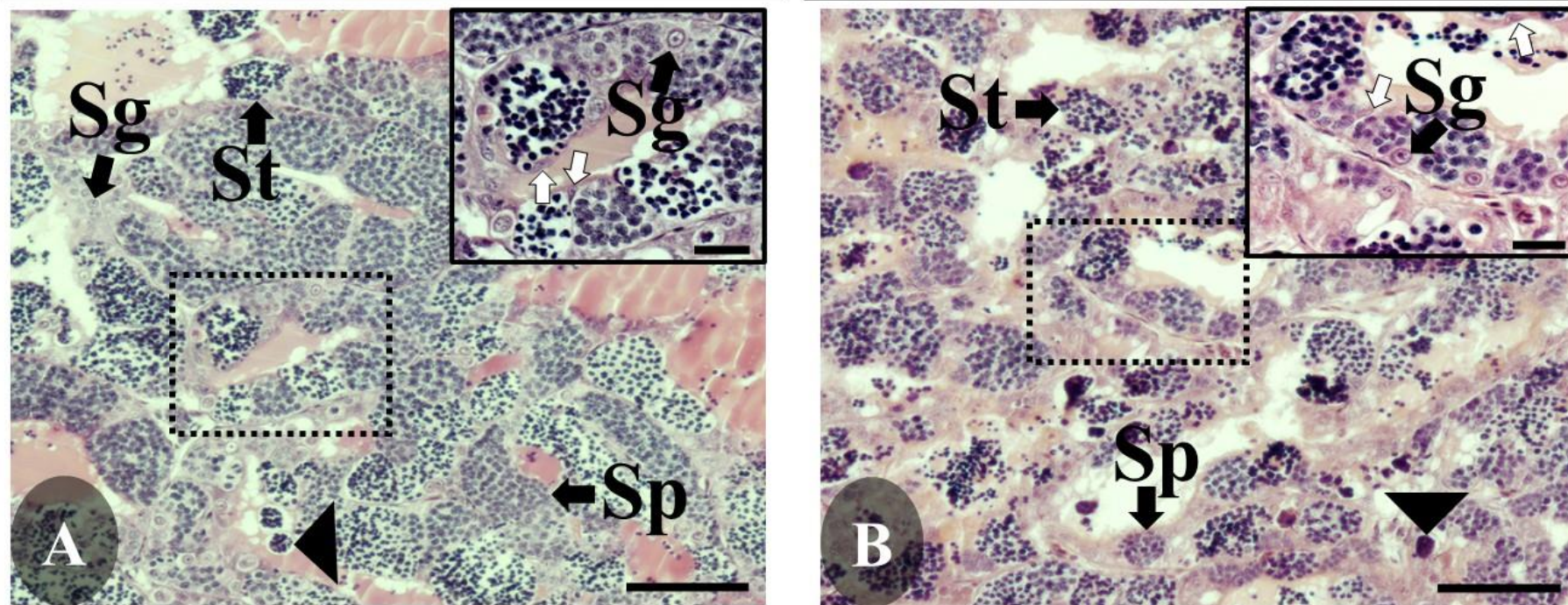
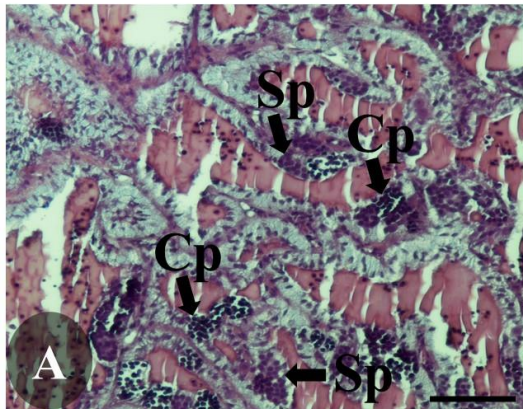
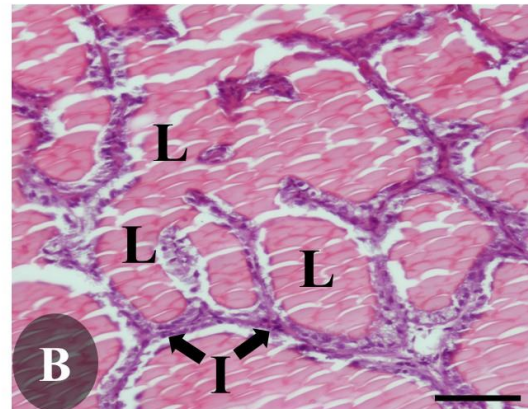


Figura 17. Testículos de lambaris juvenis triploides. **A:** Testículo de indivíduo do grupo controle aos 7 dias do experimento durante aclimação a 28°C. **B:** Testículo de indivíduo do grupo controle aos 28 dias do experimento, após a aclimação a 35°C e data da primeira aplicação de busulfan. Sg: espermatogônias; Sp: espermatócitos; St: espermátides; seta branca com contorno preto: célula de Sertoli, cabeça de seta: células com núcleo picnótico. **Escala:** A-B: 100 µm; área contornada: 50 µm.

Controle 35°C



Busulfan



Busulfan

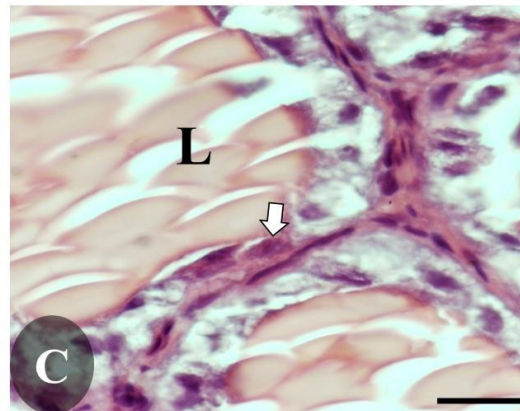


Figura 18. Testículos de lambaris juvenis triploides, aos 42 dias do experimento, na data da terceira aplicação de busulfan. **A:** Testículo de indivíduo do grupo controle. **B:** Testículo de indivíduo tratado com busulfan; **C:** Imagem em aumento maior para identificação de células de sertoli. Sp: espermatócitos; Cp: Célula com núcleo picnótica; L: Lúmen testicular; I: Interstício; Seta branca com contorno preto: célula de Sertoli. Escala: A: 200 μ m; B: 100 μ m; C: 50 μ m.

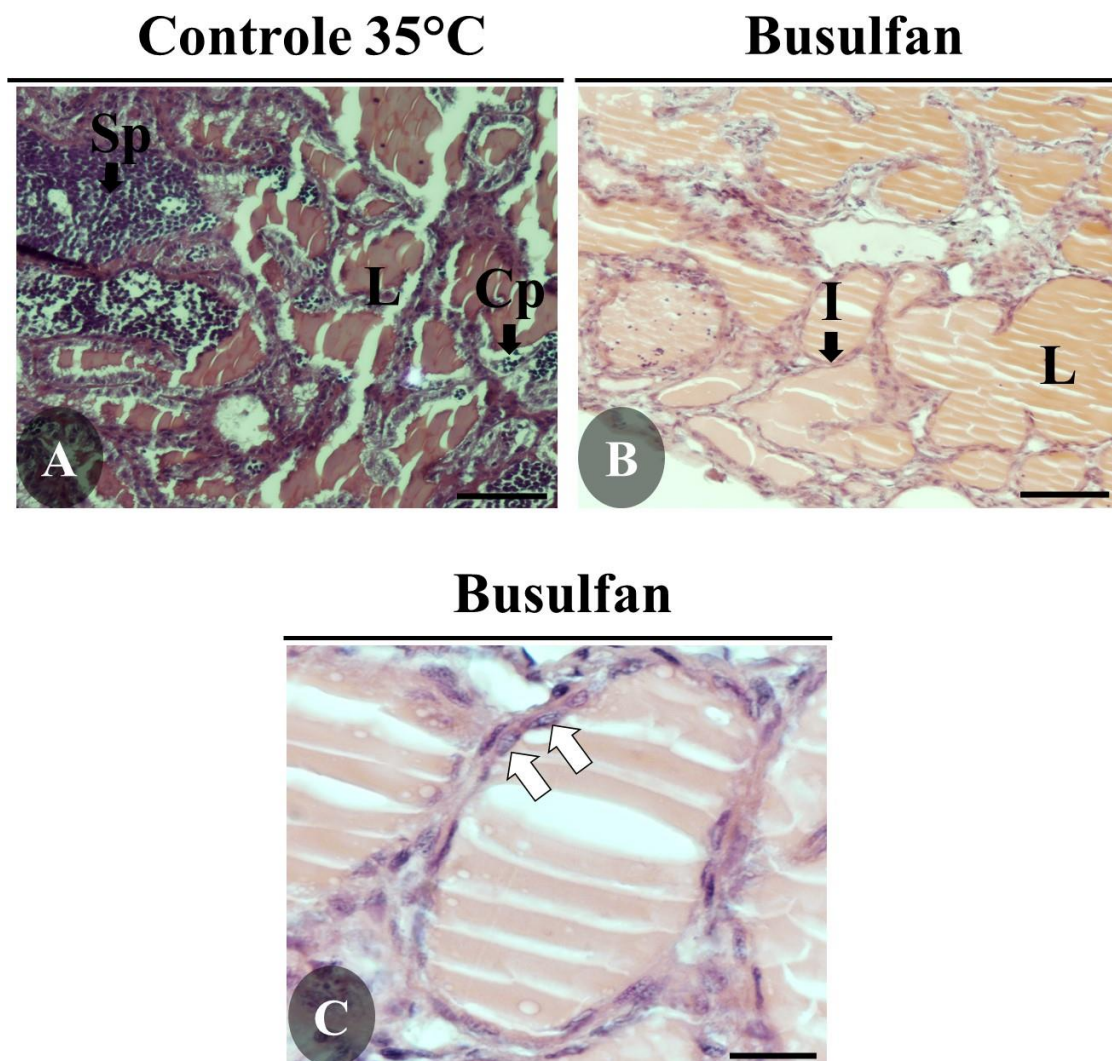


Figura 19. Testículos de lambaris juvenis triploides aos 49 dias do experimento, após a terceira aplicação de busulfan e término do tratamento. **A:** Testículo de indivíduo do grupo controle; **B:** Testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan; **C:** Imagem em maior aumento para identificação de células de sertoli. Sp: espermatócitos; Cp: Núcleo de célula picnótica; L: Lúmen testicular; I: Interstício; Seta branca com contorno preto: célula de Sertoli. **Escala:** A-B: 200 μ m; C: 50 μ m.

Aos 79 dias do experimento, um mês após o fim do tratamento com busulfan e aclimatados a 28°C, nos testículos de indivíduos do grupo controle foram observadas as presenças de espermatogônias, espermatócitos e espermátides no epitélio germinativo, porém no lúmen testicular não foi observada a presença de espermatozoides (Figura 20A). No grupo tratado com busulfan, quatro animais foram coletados, sendo que em dois deles, os testículos estavam completamente desprovidos de células germinativas e espermatozoides, observando-se unicamente lúmen testicular e células do interstício

(Figura 20B), enquanto que nos testículos dos os outros dois indivíduos foram observados algumas espermatogônias ao longo do epitélio germinativo (Figura 20C).

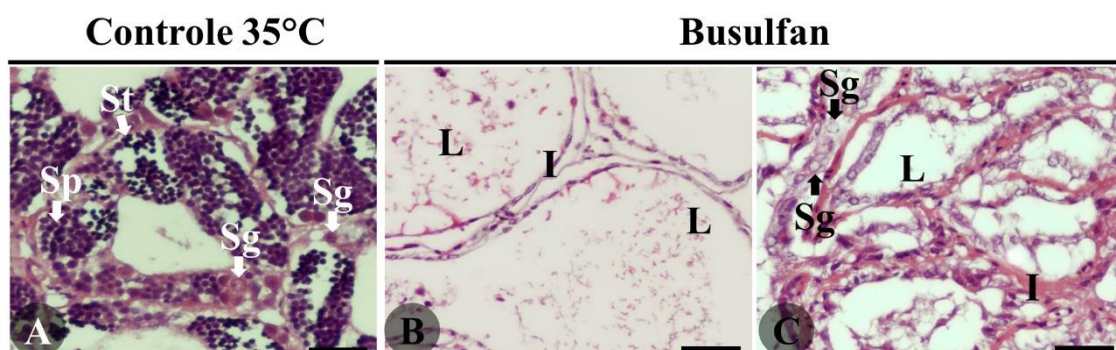
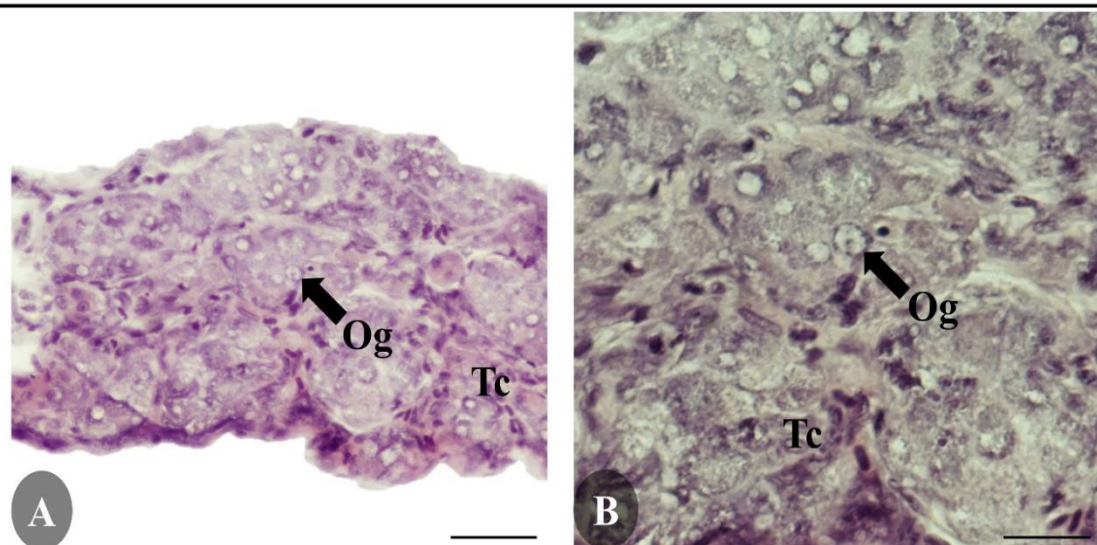


Figura 20. Testículos de lambaris juvenis triploides coletados aos 79 dias do experimento, um mês finalizado o tratamento com busulfan. **A:** Testículo de indivíduo do grupo controle; **B-C:** Testículo de indivíduo do grupo tratado com busulfan. Sg: espermatogônias; Sp: espermatócitos; St: espermátides; L: Lúmen testicular; I: Interstício. Escala: A-C: 100 μ m.

3.3.3. Análises das características morfológicas dos ovários através de histologia convencional

A análise histológica dos ovários coletados após aclimação a 28°C, no sétimo dia do experimento, indicaram oogênese inicial, sendo observadas abundantes células somáticas e oogônias (Figura 21A-B). Após aclimação a 35°C, aos 28 dias do experimento e início do tratamento com busulfan, os ovários coletados apresentavam algumas oogônias e oócitos, sendo observada na parte mediana do ovário apenas cavidade ovariana (Figura 21C-D).

Coleta 1 (28°C)



Coleta 2 (35°C)

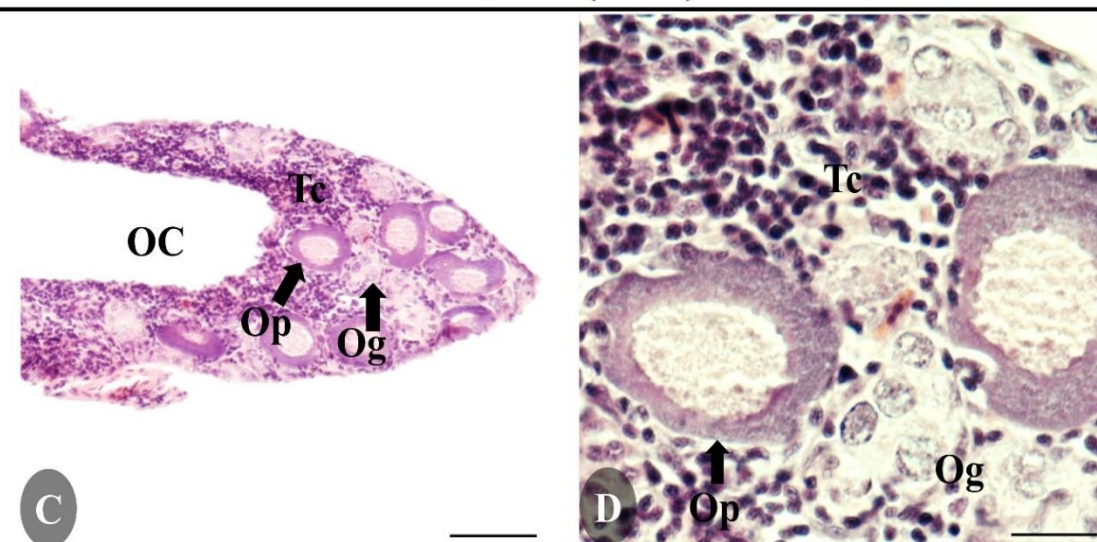


Figura 21. Ovários de lambari juvenil triploide ao sétimo e vigésimo oitavo dia do experimento. **A-B:** Ovário de indivíduo no sétimo dia do experimento, na etapa de aclimação a 28°C. **C-D:** Ovário de indivíduo no vigésimo oitavo dia do experimento, no início do tratamento com busulfan a 35°C. Og: oogônia; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo; OC: Cavidade ovariana. **Escala:** A; C: 200 µm. B; D: 50 µm.

Aos 42 dias do início do experimento após duas aplicações de busulfan, os ovários coletados apresentavam células somáticas, alguns ninhos de oogônias e oócitos primários isolados (Figura 22A-B). Aos 49 dias do experimento, após a terceira aplicação de busulfan e término do tratamento, os ovários coletados apresentavam alguns ninhos de

oogônias e oócitos primários isolados, predominando as células do tecido conjuntivo na maior parte do ovário (Figura 23A-B).

Coleta 3 B50

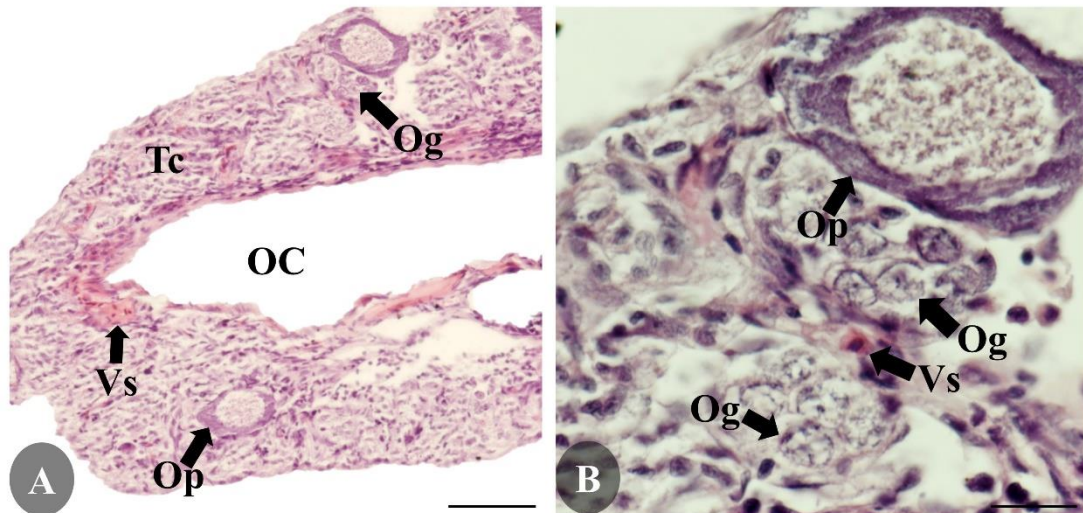


Figura 22. Ovários de lambaris juvenis triploides aos 42 dias do experimento, após duas aplicações de busulfan. **A:** Ovário de indivíduo tratada com busulfan. **B:** Imagem em maior aumento vinda de A. Og: oogônias; Op: oócitos primários; Tc: tecido conjuntivo; OC: cavidade ovariana; Vs: vaso sanguíneo. **Escala:** A: 200 μ m; B: 50 μ m.

Coleta 4 B50

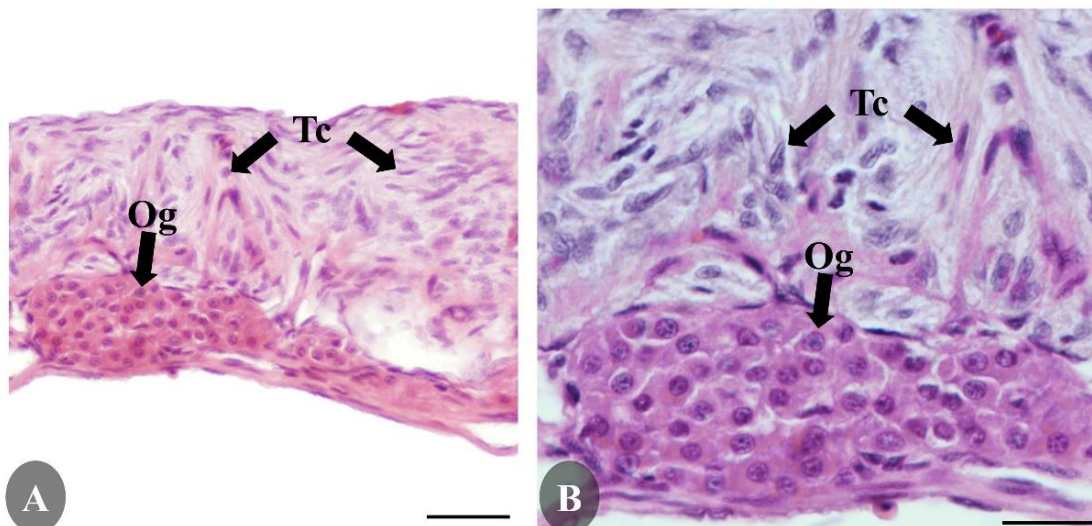


Figura 23. Ovário de lambaris juvenis triploides aos 49 dias do experimento, após a terceira aplicação de busulfan e término do tratamento. **A:** Ovário de indivíduo tratado com busulfan. **B:** Imagem em maior aumento de A. Og: oogônia; Op: oócito primário; Tc: tecido conjuntivo. **Escala:** A: 100 μ m; B: 50 μ m.

3.4 Experimento 4: Estrutura da gônada dos híbridos adultos triploides

Os testículos dos híbridos adultos triploides coletados com 10 meses de idade, tinham um índice gonadosomático de $0,44 \times 0,26$. Os testículos apresentavam uma coloração translúcida em todo o testículo (Figura 24A). Os cortes histológicos mostraram um testículo completamente livre de células germinativas, observando-se unicamente lúmen testicular e células do interstício (Figura 24B-D). Diferentemente, nas fêmeas foram identificadas oogônias e oócitos em ovário (Figura 25).

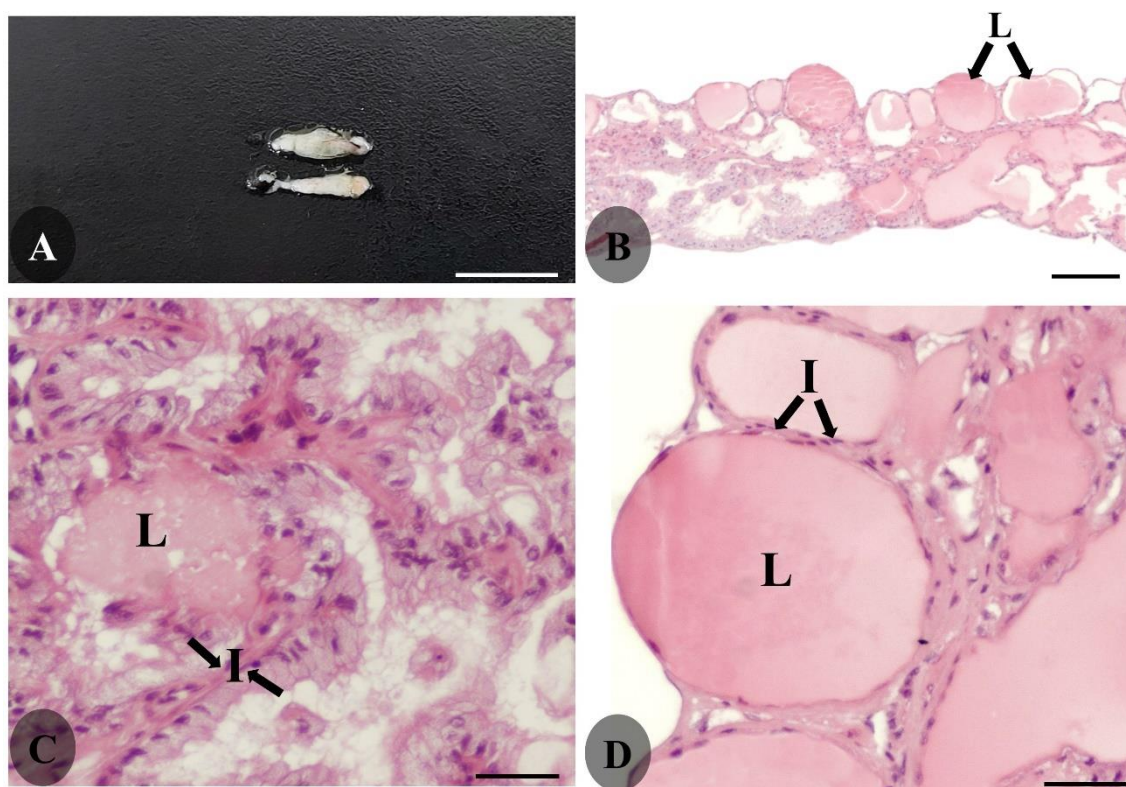


Figura 24. Testículo de híbrido adulto triploide aos 10 meses de idade. **A:** Visualização macroscópica. **B:** Visualização de lúmen testicular. **C:** Imagem em maior aumento da região caudal. **D:** Imagem em maior aumento da região central. L: Lúmen testicular; I: Interstício. **Escala:** A: 1 cm; B: 400 µm; C-D: 100 µm.

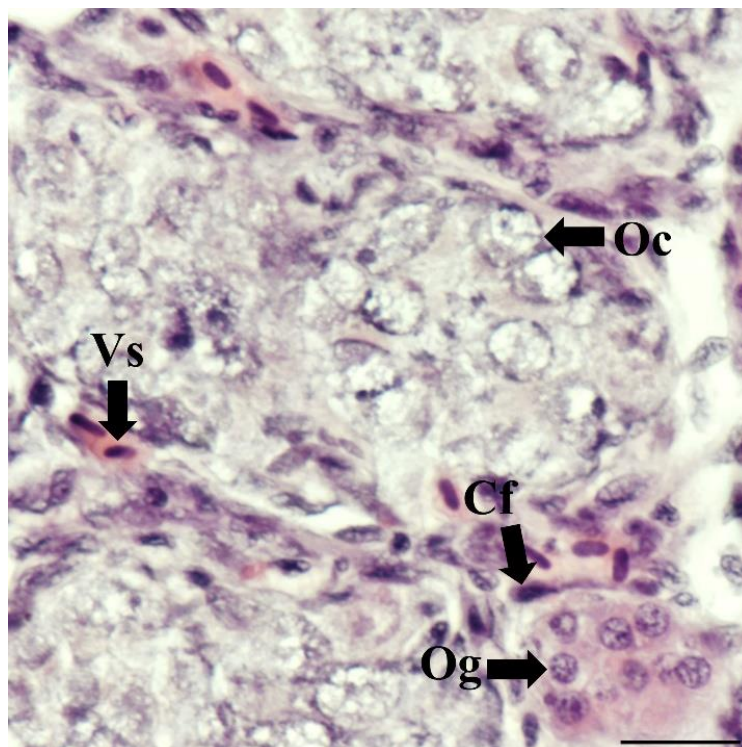


Figura 25. Ovário de híbrido adulto triploide aos 10 meses de idade. Observando-se oogônias (Og), oócitos (Oc); células foliculares (Cf) e vasos sanguíneos (Vs). **Escala:** 50 μ m.

4. DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi obter a esterilização de lambari *Astyanax altiparanae* utilizando três estratégias distintas. A depleção completa da espermatogênese em machos de lambaris diploides adultos foi obtida com sucesso, através da administração de cinco aplicações em duas dosagens de busulfan, 15 mg/kg e 40 mg/kg, em alta temperatura. No entanto, após o período de um mês do término do tratamento com busulfan, a espermatogênese foi novamente ativa, sendo mais rápida no tratamento de 15 mg/kg, uma vez no lúmen testicular era observado a presença de espermatozoides, do que na dosagem de 40 mg/kg, onde foram observados nos testículos espermatogônias e algumas regiões espermátides. Um trabalho prévio de esterilização de lambaris *Astyanax altiparanae* realizado por (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015), administrando duas dosagens de busulfan, a primeira de 18 mg/kg e a segunda de 15mg/kg em cada indivíduo com intervalos de 14 dias entre cada uma delas, evidenciou a depleção completa

da espermatogênese. No entanto, a espermatogênese foi reativada em curto período de tempo, observando-se espermatozoides endógenos no lúmen testicular do receptor, após o transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2019). Estes dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho utilizando a dosagem de 15 mg/kg. Em outros trabalhos publicados com machos de carpa *Cyprinus carpio* (MAJHI et al., 2017) e de pangaso (*Pangasianodon hypophthalmus*) (MAJHI et al., 2019), utilizando a dosagem de 40 mg/kg de busulfan em cinco aplicações, a depleção completa da espermatogênese foi obtida por longo período (cerca de 4 meses após o término do tratamento com busulfan). Neste estudo, a dosagem de 40 mg/kg de busulfan em lambaris adultos apenas retarda a volta da espermatogênese em relação a dosagem menor, mas a presença de espermatogônia um mês após o término do experimento, já indica a volta da espermatogênese. Vale ressaltar que o lambari tem precocidade para a reprodução (apto a reprodução em 4 meses) e várias desovas anuais. Estes aspectos distintos do lambari em relação a carpa e o pangaso podem contribuir para as diferenças no retorno da espermatogênese observadas nestes trabalhos.

Baseado nos resultados dos lambaris adultos diploides (experimento 1), principalmente o retorno da espermatogênese em curto período, foi lançada a estratégia de utilizar juvenis, os quais estariam em fase inicial da gametogênese, na tentativa de impedir ou evitar o retorno precoce da gametogênese. Como nos adultos a dosagem de 40 mg/kg apresentava um retorno mais tardio da espermatogênese, decidiu-se aumentar a concentração de busulfan e encontrar a melhor dosagem para os lambaris juvenis diploides. No estudo de esterilização de lambaris juvenis diploides (experimento 2), os resultados foram conclusivos utilizando apenas a dosagem de 50 mg/kg de busulfan, sendo observadas a depleção completa da espermatogênese após duas aplicações de busulfan. Na dosagem de 40 mg/kg de busulfan, foram coletadas apenas ovários aos 42

dias do experimento, após a segunda aplicação de busulfan, impedindo a comparação desta dosagem em machos tratados a 50 e 60 mg/kg, sendo que a dosagem de 50 mg/kg de busulfan já mostrava a depleção completa e a de 60 mg/kg ainda é verificada a presença de espermatogônia, porém sem espermatozoides no lúmen testicular. Além disso, os animais do grupo B40 vieram a óbito após a terceira aplicação de busulfan tornando a análise deste grupo inconclusiva. Para o grupo B60, os resultados com duas aplicações apontavam a presença de espermatogônias no epitélio germinativo e após a quarta aplicação somente fêmeas foram coletadas, tornando a análise para esta dosagem em machos inconclusiva. No entanto, acreditamos que a depleção completa possa ter ocorrido, baseado nas características dos testículos verificadas após a segunda aplicação. Infelizmente não foi possível verificar o retorno da espermatogênese em longos períodos para a comparação com os lambaris adultos diploides, uma vez que os juvenis foram mais sensíveis as aplicações de busulfan, ocasionando maior taxa de mortalidade em juvenis que adultos e impossibilitando esta análise.

Os resultados obtidos com fêmeas juvenis diploides foram mais animadores quando comparado com resultados prévios de fêmeas adultas, que não mostravam a regressão dos ovários (dados não mostrados). Os resultados indicam que a ação somente da temperatura, observada no grupo controle, é capaz de causar a regressão do ovário, atresia lamelar e eliminar oôgonias. No grupo controle aos 42 dias foi verificado a presença oôgonias enquanto que aos 56 dias apenas oócitos primários. No grupo B40 e B60, aos 42 dias (última análise deste grupo) e aos 56 dias do experimento, os ovários se encontravam similares ao do grupo controle. Para o grupo B50 não foram coletadas fêmeas nas amostragens. Similar aos machos, não pôde ser verificado se a oogênese seria reativa em longo período após o término de tratamento com busulfan. Resultados

similares foram obtidos em linguado (*Paralichthys olivaceus*) utilizando doses de busulfan de 80 e 120 mg/kg e seis aplicações por indivíduo (WANG et al., 2021).

Apesar de verificada alta mortalidade de lambaris juvenis diploides para todas dosagens de busulfan utilizadas, em especial a de 40 mg/kg. Tem sido reportado que a dose subletal de busulfan em juvenis da espécie senegalese sole (*Solea senegalensis*) é de 80 mg/kg (PACCHIARINI; SARASQUETE; CABRITA, 2014). Em nossos experimentos utilizamos dosagens menores (40, 50 e 60 mg/kg) que a dosagem subletal usada em senegalese sole. No pejerrey da patagônia (*Odontesthes hatcheri*), após o tratamento com busulfan foram observados ulcerações e algumas mortalidades nos peixes que receberam a maior dose de busulfan (40 mg/kg) sendo principalmente fêmeas (MAJHI et al., 2009a). Em outras espécies como o linguado (*Paralichthys olivaceus*), carpa (*Cyprinus carpio*) e o bagre (*Pangasianodon hypophthalmus*), com doses de 80-120 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente, não foi observado efeito letal do busulfan, podendo ser os efeitos do busulfan espécie-específica (MAJHI et al., 2017, 2019; WANG et al., 2021).

A estratégia utilizada no experimento 3 é inédita na literatura e envolve a associação de duas metodologias de esterilização. Inicialmente, a manipulação cromossômica foi usada para geração de lambaris triploides estéreis, que ainda apresentavam células germinativas nas gônadas de machos e fêmeas, previamente evidenciados. Baseado nos dados promissores do tratamento químico com busulfan em lambaris juvenis diploides (50 mg/kg de busulfan e depleção completa da espermatogênese com duas aplicações), os lambaris juvenis triploides foram submetidos ao tratamento químico com busulfan para a depleção da gametogênese. Nos juvenis triploides foram administradas três aplicações, para garantir a depleção completa da espermatogênese, e diminuindo uma aplicação de busulfan visando a maior sobrevivência

dos animais. Esta estratégia foi utilizada para eliminar a barreira física formada pelas células germinativas das gônadas dos lambaris juvenis triploides, permitindo que as gônadas fossem colonizadas por células exógenas transplantadas, bem como atrasar a gametogênese das células endógenas do receptor a longo prazo. Assim as células transplantadas teriam tempo hábil de colonizar a gônada do receptor.

A depleção completa da espermatogênese foi obtida com sucesso pela primeira vez em lambaris triploides, utilizando três aplicações de busulfan na dosagem de 50 mg/kg. Nos animais coletados aos 30 dias após o término do tratamento com busulfan, metade dos animais (n=4) não apresentam células germinativas no epitélio germinativo, enquanto que na outra metade, apresentava algumas espermatogônias no epitélio germinativo, indicando que a espermatogênese endógena estaria em progresso. No entanto, em lambaris juvenis triploides a espermatogênese parece demorar mais tempo para ser ativada, quando comparada com lambari diploides adultos, visto que em todos adultos, aos 30 dias após finalizar o tratamento com busulfan, eram observadas a presença de espermatogônias, tanto neste trabalho com em outro previamente publicado (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2019). Isto indica que o uso de lambaris juvenis triploides seria a estratégia mais indicada para a geração de receptores de células germinativas, que os lambaris diploides adultos. Infelizmente esta comparação não pode ser realizada com lambaris juvenis diploides devido à alta incidência de óbitos neste experimento. De acordo com trabalhos realizados por (FERREIRA DO NASCIMENTO et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2018) só alguns machos triploides produzem espermatozoides apresentando baixas taxas de fertilização e não obtendo sobrevivência dos descendentes. Este fato seria vantajoso no transplante usando lambaris triploides como receptores, pois evitaria hibridação de descendentes entre as espécies doadoras e receptoras (LACERDA et al., 2010; MAJHI et al., 2009b).

Os resultados obtidos com o uso de fêmeas não foram totalmente satisfatórios, no entanto o uso de juvenis diploides e triploides aparentaram avanços na esterilização de fêmeas quando comparado com fêmeas adultas. Nos juvenis diploides, a ação da temperatura alta durante o experimento parece ter resultados similares ao grupo tratado com busulfan, como redução da gônada e atresia lamelar. No experimento de juvenis diploides, nas fêmeas não pode ser verificada a volta da oogênese, enquanto que no experimento com juvenis triploides de fêmeas utilizando três aplicações de busulfan, foi verificado após 30 dias do término do tratamento o retorno da oogênese. Outros experimentos devem ser realizados para a obtenção completa da oogênese em fêmeas juvenis diploides e triploides, seja por esterilização química, uso de temperatura alta na fase larval (NOZU; NAKAMURA, 2020), ou através da hibridação de espécies (HU et al., 2021; PONJARAT et al., 2019) ou mediante a associação da hibridação e a manipulação cromossômica como foi realizado por (PIVA et al., 2018; XU et al., 2020). Estas duas últimas alternativas tem demonstrado resultados satisfatórios no transplante de células germinativas, posto que os animais unicamente possuem em suas gônadas células de suporte evitando assim, competição por espaço e nutrientes entre as endógenas e exógenas (DOBRINSKI, 2006).

5. CONCLUSÃO

O uso da esterilização química com busulfan, nos três experimentos propostos, foi eficaz para a completa depleção total da espermatogênese em lambaris (*Astyanax altiparanae*) adultos diploides, juvenil diploides e em juvenis triploides. Em juvenis triploides o retorno da espermatogênese parece ser mais lento que em adultos diploides. Portanto, o uso de machos de lambaris juvenis triploides parece ser mais indicado que adultos diploides como receptores de células germinativas, principalmente pelo fato das células germinativas transplantadas ter um período de tempo maior para a colonização da

gônada receptora. Além disso, a esterilização de juvenis (2 a 3 aplicações) é mais rápida que em adultos (3 a 4 aplicações), reduzindo o tempo de experimento. A comparação da retomada da espermatogênese entre lambaris juvenis diploides com juvenis triploides e adultos diploides não foi possível de ser realizada devido aos óbitos dos juvenis diploides, após a quarta dosagem de busulfan, isto indica maior sensibilidade dos juvenis ao busulfan que os adultos. A depleção da oogênese não foi obtida com sucesso em nenhuma estratégia utilizada. No entanto, juvenis diploides e triploides parecem ser mais indicados que fêmeas adultas diploides (avaliadas previamente e não utilizadas no experimento 1 devido aos resultados obtidos). Ainda assim, este foi o primeiro relato de regressão de ovário e atresia lamelar em fêmeas de lambaris juvenis diploides e triploides, com o uso de busulfan e temperatura alta. O sucesso da depleção da espermatogênese e oogênese em animais triploides torna-se uma ferramenta importante, pois evitaria a ocorrência de hibridização entre as espécies doadora e receptora de células germinativas. No entanto, utilizar como receptores animais completamente estéreis, como os lambaris híbridos adultos triploides garante um maior sucesso no transplante de células germinativas, apesar das fêmeas ter oogônias e oócitos no ovário, outras estratégias como temperatura alta ou tratamento químico busulfan poderiam ser aplicados para eliminar estas células germinativas.

6. REFERÊNCIAS

ADAMOV, N. S. DE M. et al. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, 2017.

ADOLFI, M. C. et al. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *astyanax*

altiparanae. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, 2015.

BERTOLINI, R. M. et al. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, p. 68–74, 2018.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H. et al. 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.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H. et al. Preliminary study on testicular germ cell isolation and transplantation in an endangered endemic species *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, 2019.

DOBRINSKI, I. Transplantation of germ line stem cells for the study and manipulation of spermatogenesis. **Ernst Schering Research Foundation workshop**, n. 60, p. 175–193, 2006.

FERREIRA DO NASCIMENTO, N. et al. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. **Zygote**, v. 25, n. 4, p. 537–544, 2017.

HU, W. et al. Defective germplasm assembly and germ cell development contribute to hybrid sterility in yellow catfish. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 9, p. 4166–4175, 2021.

LACERDA, S. M. S. N. et al. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. 1–9, 2010.

MAJHI, S. K. et al. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult

Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1162–1172, 2009a.

MAJHI, S. K. et al. Germ cell transplantation using sexually competent fish: An approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. 1–8, 2009b.

MAJHI, S. K. et al. Heat and chemical treatments in adult *Cyprinus carpio* (Pisces cypriniformes) rapidly produce sterile gonads. **Animal Reproduction Science**, v. 183, n. June, p. 77–85, 2017.

MAJHI, S. K. et al. Depletion of endogenous germ cells in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) by heat–chemical treatments. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 12, p. 1560–1566, 2019.

NOZU, R.; NAKAMURA, M. Influence of prolonged cultivation on sexual characteristics of sterilized female tilapia, *Oreochromis mossambicus*, induced by high-temperature treatment. **Aquaculture**, v. 524, n. March, p. 735245, 2020.

PACCHIARINI, T. et al. Busulfan administration produces sublethal effects on somatic tissues and inhibits gametogenesis in Senegalese sole juveniles. **Histology and Histopathology**, v. 29, n. 5, p. 619–628, 2014.

PACCHIARINI, T.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Development of interspecies testicular germ-cell transplantation in flatfish. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 5, p. 690–702, 2014.

PIVA, L. H. et al. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? **Theriogenology**, v. 108, p. 239–244, 2018.

PONJARAT, J. et al. Evidence of dramatic sterility in F 1 male hybrid catfish

[male *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) × female *C. macrocephalus* (Günther, 1864)] resulting from the failure of homologous chromosome pairing in meiosis I. **Aquaculture**, v. 505, n. February, p. 84–91, 2019.

TAKEUCHI, Y. et al. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock. **Aquaculture**, v. 494, p. 45–56, 2018.

WANG, W. et al. Effects of busulfan on somatic cells after inhibiting germ cells in the gonads of the young olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Animal Reproduction Science**, v. 228, n. July 2020, p. 106746, 2021.

XAVIER, P. L. P. et al. A flow cytometry protocol to estimate DNA content in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. SEP, 2017.

XU, D. et al. Production of donor-derived eggs after ovarian germ cell transplantation into the gonads of adult, germ cell-less, triploid hybrid fish. **Biology of Reproduction**, v. 103, n. 6, p. 1289–1299, 2020.

YASUI, G. S. et al. Improvement of gamete quality and its short-term storage: An approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 39, n. 11, p. 464–470, 2014.

Capítulo III. Transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) utilizando como receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (*Astyanax altiparanae*) e híbridos adultos triploides (*A. altiparanae* X *A. fasciatus*)

RESUMO

No presente trabalho foi realizado o transplante de espermatogônia-tronco da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) para machos de lambaris “juvenis” triploides (*Astyanax altiparanae*), previamente tratados com busulfan, e machos de lambaris híbridos adultos triploides estéreis (*Astyanax altiparanae* × *Astyanax fasciatus*). Os lambaris triploides usados são provenientes das mesmas desovas da queles produzidos para o estudo de esterilização dos lambaris juvenis triploides no Capítulo 2. Os receptores “juvenis” triploides de *A. altiparanae* receberam transplante de espermatogônia-tronco recém isoladas, enquanto que os híbridos adultos triploides foram transplantadas células recém isoladas e células criopreservadas. As células transplantadas foram previamente marcadas com o marcador de membrana fluorescente PKH26, permitindo a visualização destas células nas gônadas dos receptores. Os testículos dos animais transplantados e não transplantados (controle) foram coletados para avaliação da colonização das células transplantados nas gônadas dos receptores. As amostras foram processadas por histologia convencional e as lâminas obtidas foram analisadas mediante microscopias de fluorescência e óptica. Os campos positivos ao PKH26 foram marcados e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para identificação, na microscopia óptica, do tipo celular observado na microscopia de fluorescência. Nos testículos dos receptores de lambaris “juvenis” triploides foi verificado, aos 23 dias após transplante, a presença de espermatogônias PKH26 positivas. Após 42 e 80 dias da realização do transplante foi identificado espermatogônias e espermátocitos PKH26 positivos. Nos receptores híbridos adultos triploides, transplantados com células recém isoladas, foi identificado epitélio germinativo inicial aos 10 dias após o transplante. Aos 20 dias após transplante, foi observada a proliferação de espermatogônias, colonizando os testículos dos receptores. Nos receptores híbridos adultos triploides, transplantados com células criopreservadas, foram identificadas espermatogônias e alguns espermátocitos nos testículos receptores aos 20 dias após o transplante. Os resultados obtidos de isolamento e criopreservação de espermatogônia-tronco e o posterior transplante via papila urogenital, utilizando os receptores “juvenis” triploides tratados com busulfan, e híbridos adultos triploides são inéditos, inovadores e promissores para obtenção de quimera germinativa funcional e, consequentemente, para conservação do material genético e reconstituição da piracanjuba (*B. orbignyanus*) em caso de extinção.

Palavras chave: Quimera germinativa. Manipulação cromossômica. Hibridação entre espécies. Esterilização química. Espécie ameaçada.

1. OBJETIVOS

1.1. *Objetivo geral*

Obter quimera germinativa pelo transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba (*Brycon orbignyana*) em receptores esterilizados pelas associações dos métodos de manipulação cromossômica e esterilização química e de hibridação entre espécies e manipulação cromossômica.

1.2. *Objetivos específicos*

- Realizar o transplante de espermatogônia-tronco da piracanjuba *Brycon orbignyana*, após purificação e marcação fluorescente com PKH26, utilizando como receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (*Astyanax altiparanae*), tratados previamente com o agente químico busulfan.
- Realizar o transplante de espermatogônia-tronco, recém purificadas e criopreservadas e marcadas por fluorescência com PKH26, em receptores adultos de híbridos triploides (*Astyanax altiparanae* × *Astyanax fasciatus*) usando células recém isoladas e células criopreservadas.
- Avaliar a presença das células germinativas-tronco transplantadas nos testículos dos receptores utilizando métodos histológicos, microscopia de fluorescência e microscopia óptica.
- Comparar a eficácia dos transplantes entre os receptores “juvenis” triploides de lambaris, tratados com busulfan em alta temperatura, e adultos híbridos triploides de lambaris (*A. altiparanae* e *A. fasciatus*).
- Comparar a eficácia da colonização das células transplantadas, recém purificadas e criopreservadas, nos testículos de adultos híbridos triploides de lambaris.

Definir o melhor receptor utilizado para o transplante de espermatogônias-tronco de piracanjuba.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (*Astyanax altiparanae*) e machos de lambaris adultos híbridos triploides (*Astyanax altiparanae* × *Astyanax fasciatus*)

Os lambaris juvenis triploides usados neste capítulo são provenientes das mesmas desovas daqueles produzidos para o estudo de esterilização dos lambaris juvenis triploides no Capítulo 2, subtítulo “**2.3.3. Depleção da gametogênese em lambaris juvenis triploides**”. Portanto, no momento do transplante eles estavam com 3,5 meses de idade. Neste capítulo, os juvenis triploides foram chamados de “juvenis” triploides para diferenciar a idade dos mesmos. No experimento de esterilização eles estavam com 2 meses de idade e no experimento do transplante 3,5 meses de idade.

Os machos de lambaris “juvenis” triploides, aos 3,5 meses de idades foram tratados com busulfan na dosagem 50 mg/kg, seguindo os procedimentos descritos no Capítulo 2 e utilizados no transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba.

Os machos de lambaris híbridos adultos triploides foram analisados por citometria de fluxo, aos 10 meses de idade, para a seleção dos animais triploides, conforme descrito no Capítulo 2 no subtítulo “**2.3.2 Confirmação da triploidização**”. Os animais machos triploides selecionados foram utilizados na etapa de transplante de espermatogônias-tronco de piracanjuba.

2.2 Isolamento de espermatogônia-tronco de piracanjuba *Brycon orbignyanus* pelos métodos de dissociação enzimática e gradiente de percoll

Na etapa de isolamento de espermatogônia-tronco de piracanjuba foram utilizados quatro animais adultos, com oito anos de idade, e dois juvenis, com 15 meses de idade. Os animais foram eutanasiados em eugenol na concentração de 200 mg/L (Biodinâmica, Brasil). Os testículos foram coletados e pesados, apresentando uma média de $0,43 \pm 0,01$

g. O procedimento de isolamento, utilizando os métodos de dissociação enzimática e gradiente de densidade por percoll, foram realizados seguindo os procedimentos descritos no Capítulo 1, no subtítulo **“2.3. Isolamento de espermatogônias-tronco”**.

As bandas de 20% e 30% do gradiente de densidade de percoll, que apresentam a maior concentração de espermatogônias-tronco, como descrito no Capítulo 1, foram coletadas e transferidas para tubos de 15 mL de centrífuga. Em cada tubo foi adicionado 10 mL de meio L-15 suplementado e centrifugada a 300 x g por 8 minutos a 25°C, para remoção de percoll. Em seguida, as células depositadas nos fundos dos tubos de centrífuga foram suspensas em 1 mL de meio L-15 suplementado. A concentração de espermatogônia-tronco foi determinada utilizando câmara de Neubauer e a viabilidade foi verificada utilizando o azul de tripan 0.4% (Gibco #15250061, Grand Island, USA).

2.3 Criopreservação de espermatogônias-tronco

O processo de criopreservação e descongelamento das soluções celulares foram realizados seguindo os procedimentos descritos no Capítulo 1, no subtítulo **“2.5.2. Criopreservação de espermatogônias-tronco”**. As células espermatogoniais provenientes de duas piracanjubas adultas foram sometidas ao processo de criopreservação, utilizando a solução crioprotetora (propanodiol 1M, 50 mM de glicose e 0,5% de soro de albumina preparados em solução de Hanks) que apresentou maior viabilidade celular após descongelamento, como descrito no Capítulo 1, no subtítulo **“3.5. Viabilidade das espermatogônias-tronco após criopreservação”**. Após descongelamento a concentração e viabilidade celular foi verificada através da câmara de Neubauer e do corante azul de Tripan a 0,4% (Gibco #15250061, Grand Island, USA). As espermatogônias-tronco utilizadas no transplante foram aquelas oriundas do gradiente de densidade de percoll nas etapas de purificação, tanto para o transplante de células recém purificadas como no transplante das células criopreservadas. Conforme discutido no

Capítulo 1, apesar da etapa de plaqueamento diferenciação apresentar maior pureza de espermatogônias-tronco, a etapa do gradiente de densidade de percoll apresentou maior expressão do gene *ddx4*, indicando que nesta etapa de purificação, as células podem estar com integridade das características de células germinativas tronco, que as células purificadas na etapa do plaqueamento diferencial.

2.4 Marcação de espermatogônia-tronco com o marcador de membrana fluorescente PKH26

Antes de realizar o transplante via papila urogenital, as espermatogônias-tronco foram sometidas a marcação utilizando o marcador de membrana fluorescente PKH26 (Sigma-Aldrich #MKCK8658, St. Louis, USA). Para tal, o pellet celular proveniente do fracionamento de gradiente de percoll foi suspenso em 1 mL meio L-15 suplementado, posteriormente foi adicionado 8 µL do corante PKH26, incubado por 10 minutos. Após este período, foi adicionado 1 mL de soro fetal bovino e incubado por um minuto para inativar o marcador fluorescente. Posteriormente, o volume da suspensão celular foi aumentado até 10 mL de meio L-15 suplementado e centrifugado a $300 \times g$ durante 5 minutos. Foram realizadas três lavagens com o mesmo meio, com a finalidade de eliminar o excesso de corante e de soro fetal bovino das células.

2.5 Transplante em receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (*A. altiparanae*) tratados previamente com busulfan

O transplante de espermatogônia-tronco foi realizado em 27 receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (*A. altiparanae*), com 3,5 meses de idade, previamente tratados com busulfan, de acordo como descrito no Capítulo 2, no subtítulo “**2.3.3. Depleção da gametogênese em lambaris juvenis triploides**”. A concentração celular utilizada foi de $2,6 \times 10^6$ espermatogônia/mL, com 93 % de viabilidade celular. Para tal, utilizou-se uma seringa de insulina acoplada a uma ponteira, sendo injetado

aproximadamente 70 µL da suspensão celular, sendo transplantadas em cada receptor cerca de $1,9 \times 10^5$ espermatogônias-tronco, via papila urogenital. Antes de iniciar todos os procedimentos experimentais, os animais receptores foram anestesiados em uma solução de eugenol na concentração de 100 mg/L (Biodinâmica, Brasil).

2.6 Transplante em receptores machos de lambaris híbridos adultos triploides (*Astyanax altiparane* × *Astyanax fasciatus*)

O transplante em receptores machos de lambaris híbridos adultos triploides foi realizado em 24 animais com 11 meses de idade. Estes animais foram divididos em dois grupos, com 12 indivíduos em cada grupo ($n = 12$). No primeiro grupo, o transplante foi realizado utilizando espermatogônias-tronco recém isoladas, provenientes de juvenis de piracanjuba ($n = 2$). Após o isolamento, a concentração celular foi de $2,3 \times 10^6$ espermatogônia/mL, com 92% de viabilidade celular. No segundo grupo, células criopreservadas foram utilizadas nos transplantes em concentração celular de $2,9 \times 10^6$ espermatogônia/mL com 88% de viabilidade celular. O transplante foi realizado seguindo os procedimentos realizados no subtítulo anterior deste capítulo, “**2.3 Transplante em receptores machos de lambaris “juvenis” triploides (*A. altiparanae*) previamente tratados com busulfan**”. Aproximadamente 70 µL da suspensão celular, contendo cerca de $1,9 \times 10^5$ espermatogônia tronco recém isoladas e $2,4 \times 10^5$ espermatogônia-tronco criopreservadas, foram transplantadas em cada receptor, via papila urogenital. Antes de iniciar todos os procedimentos experimentais, os animais receptores foram anestesiados em uma solução de eugenol na concentração de 100 mg/L (Biodinâmica, Brasil).

2.7 Avaliação de quimerismo por histoquímica

Os testículos dos animais receptores foram coletados e fixados em bouin (Êxodo Científica #FB08835SO, Sumaré, Brasil) durante 24 horas e posteriormente, transferidos para etanol a 70% até a retirada do excesso de bouin das amostras. As amostras foram

submetidas a desidratação utilizando concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e em seguida, embebidas em paraplast (Sigma # SLBS8607, St. Louis, USA). Os blocos de parafina foram cortados na espessura de 5 µm, utilizando micrótomo equipado com lâmina aço (Leica RM2235, Lincolnshire, USA). O material cortado foi examinado por microscopia de fluorescência (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e fotografado (NikonDSRi2, Nikon, Tóquio, Japão). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e eosina para identificação dos tipos celulares, previamente visualizadas pelo marcador fluorescente PKH26.

3. RESULTADOS

3.1 Transplante de espermatogônia-tronco em lambari triploide tratado previamente com busulfan

Após o transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba nos 27 lambaris “juvenis” triploides tratados com busulfan, foram registrados óbitos (n= 10) dos receptores nos dias seguintes ao transplante. No dia do transplante, foi realizada uma coleta de testículos não transplantados, como controle das características morfológicas interna da gônada no momento do transplante. Esta análise evidenciou que os testículos estavam desprovidos de células germinativas, sendo visualizado apenas lúmen testicular, interstício e células de sertoli (Figuras 1A-B). Aos 23 dias após transplante, nos machos analisados (n= 2), foram observadas células PKH26 positivas nos testículos dos receptores (Figuras 2A-2E), e através da coloração com hematoxilina e eosina foram identificados cistos de espermatogônias distribuídas pelo epitélio germinativo (Figuras 2B, 2C, 2D e 2F). Aos 42 dias após transplante, também foram visualizadas células marcadas com PKH26 nos testículos dos receptores (Figura 3A). A coloração da lâmina por hematoxilina e eosina evidenciou que as células PKH26 positivas eram espermatogônias e alguns espermátocitos (Figura 3B). Aos 80 dias após transplante, ainda

foram observados espermatogônias e espermátocitos marcados com PKH26 nos testículos dos receptores, distribuídas pelo epitélio germinativo (Figuras 4A-B).

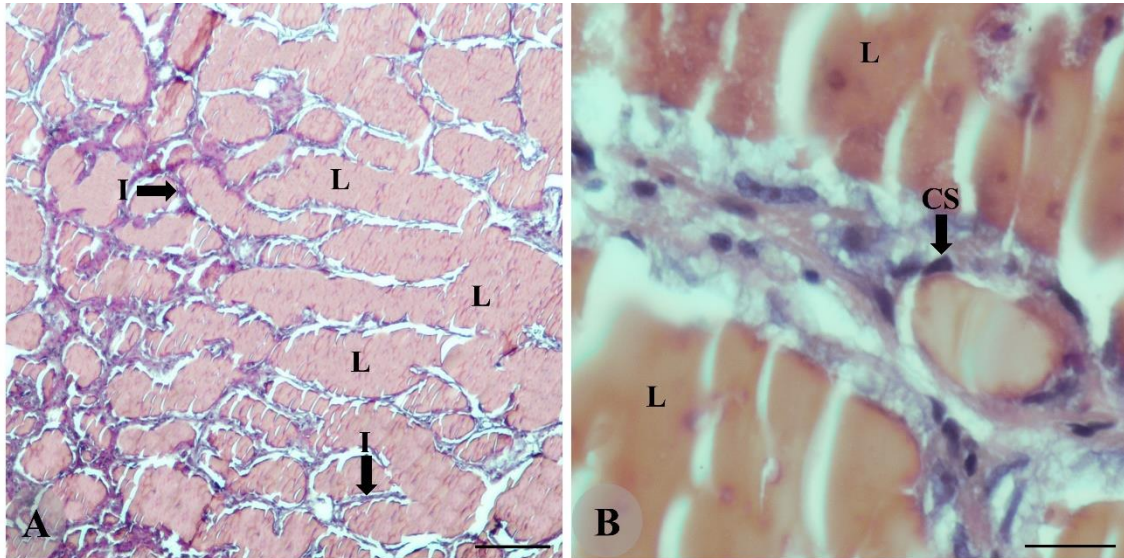


Figura 1. Testículo de lambari “juvenil” triploide, após o tratamento com busulfan. Controle experimental das características morfológicas do testículo no momento da realização do transplante. **A:** Testículo do indivíduo visualizado em menor aumento, confirmando a depleção completa da espermatogênese pelo tratamento com busulfan, **B:** Visualização em maior aumento de região da Figura A, sendo identificado a presença de células de Sertoli. L: Lúmen testicular; I: Interstício; CS: Célula de sertoli. **Escala:** A: 400 μ m; B: 50 μ m.

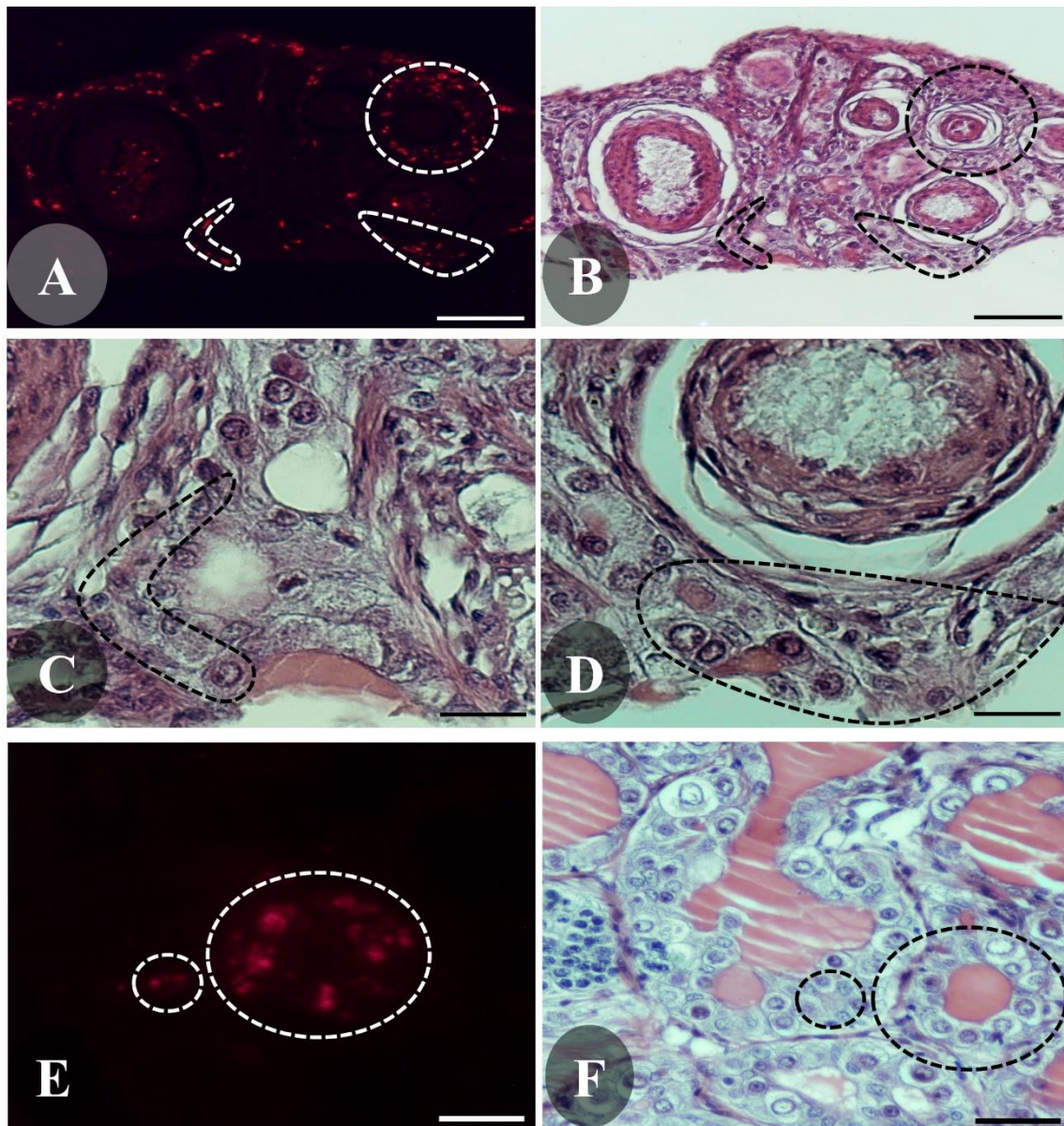


Figura 2. Testículos de “juvenis” triploides analisadas por microscopia de fluorescência e óptica, aos 23 dias após o transplante. **A; E:** Linhas ponteadas em branco indicam regiões contendo espermatogônias marcadas com PKH26, visualizadas por microscopia de fluorescência. **B:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **A**, sendo a lâmina corada com hematoxilina e eosina. **C-D:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **A** em maior aumento, identificando as espermatogônias. **F:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **E**, sendo a lâmina corada com hematoxilina e eosina. As linhas ponteadas em preto indicam as regiões onde foram identificadas as espermatogônias marcadas com PKH26. **Escala:** A, B: 200 µm; F: 100 µm; C, D, E: 50 µm.

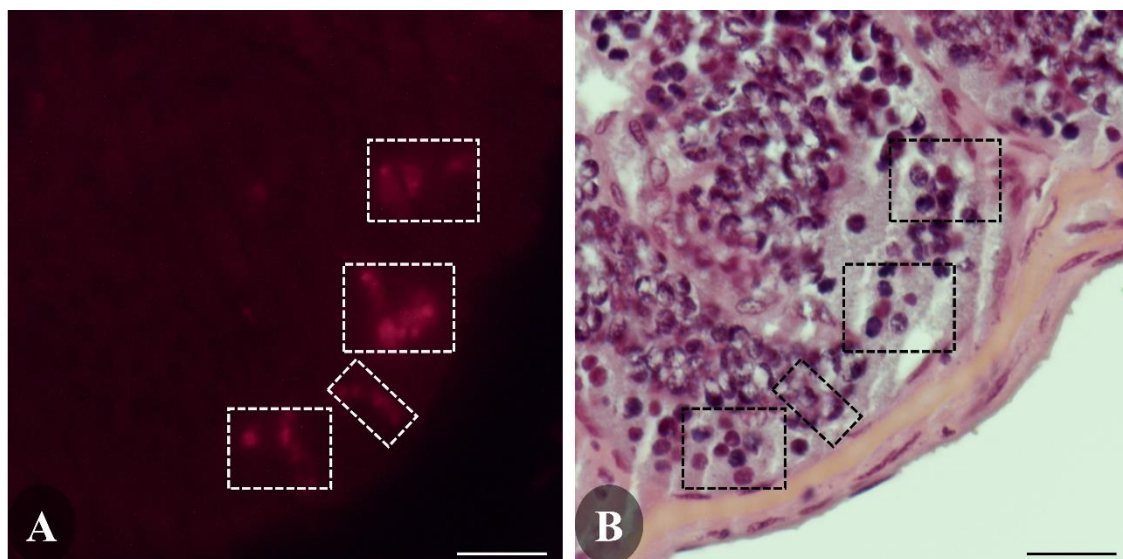


Figura 3. Testículo de “juvenil” triploide analisada por microscopia de fluorescência e óptica, aos 42 dias após transplante. **A:** Linhas ponteadas em branco indicam regiões contendo células germinativas PKH26 positivas, visualizadas por microscopia de fluorescência. **B:** Análise em microscopia óptica das regiões delimitadas em **A**, sendo a lâmina corada com hematoxilina e eosina, evidenciando as células germinativas. Linhas ponteadas em preto indica as regiões onde foram identificados espermatogônias e espermátocitos PKH26 positivos. **Escala:** A-B: 50 μ m.

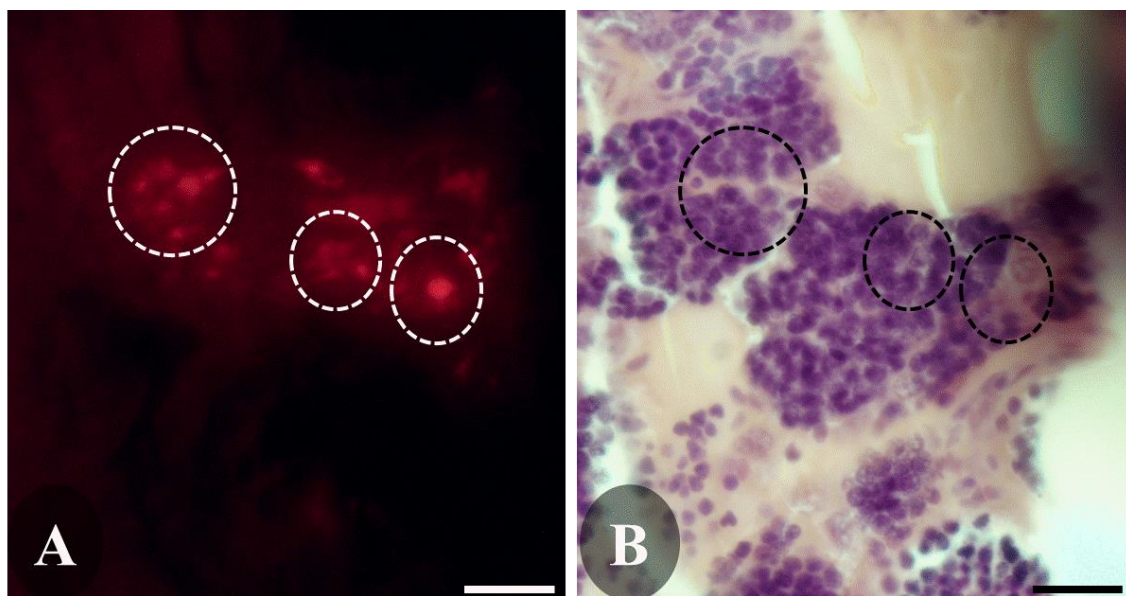


Figura 4. Testículo de “juvenil” triploide analisada por microscopia de fluorescência e óptica, aos 80 dias após transplante. **A:** Análise por microscopia de fluorescência, onde as linhas ponteadas em branco indicam regiões de espermatogônias marcadas com PKH26. **B:** Análise por microscopia óptica, com lâmina corada com hematoxilina e eosina, das regiões delimitadas em **A**. Linhas ponteadas em preto indicam as regiões onde foram identificados as espermatogônias e espermátocitos PKH26 positivos, em **A**. **Escala:** A-B: 50 μ m.

3.2 Transplante de espermatogônia-tronco para machos de híbridos adultos triploides

Nos testículos dos receptores de espermatogônia-tronco, recém isoladas, foram visualizadas células PKH26 positivas, aos 10 dias após transplante (Figuras 5A e 5B). Através da contra coloração com hematoxilina e eosina foi evidenciado o desenvolvimento inicial do epitélio germinativo, uma vez que os testículos dos animais controles estavam livre de células germinativas (Figura 6A e 6B). Ainda reforçando esta afirmação, os machos híbridos adultos triploides são desprovidos de células germinativas, sendo este evento ocorrido pela associação das metodologias de esterilização de hibridação entre espécies e manipulação cromossômica, como discutido no Capítulo 2, no subtítulo (3.4. *Experimento 4: Estrutura da gônada dos híbridos adultos triploides*). Aos 20 dias após transplante, nos testículos transplantados, com células recém isoladas e criopreservadas, foi verificado o processo de espermatogênese inicial, com presença de espermatogônias tronco e alguns espermatócitos (Figuras 7A-D). Os testículos dos indivíduos do grupo controle, sem transplante estavam desprovidos de células germinativas (Figura 7A).

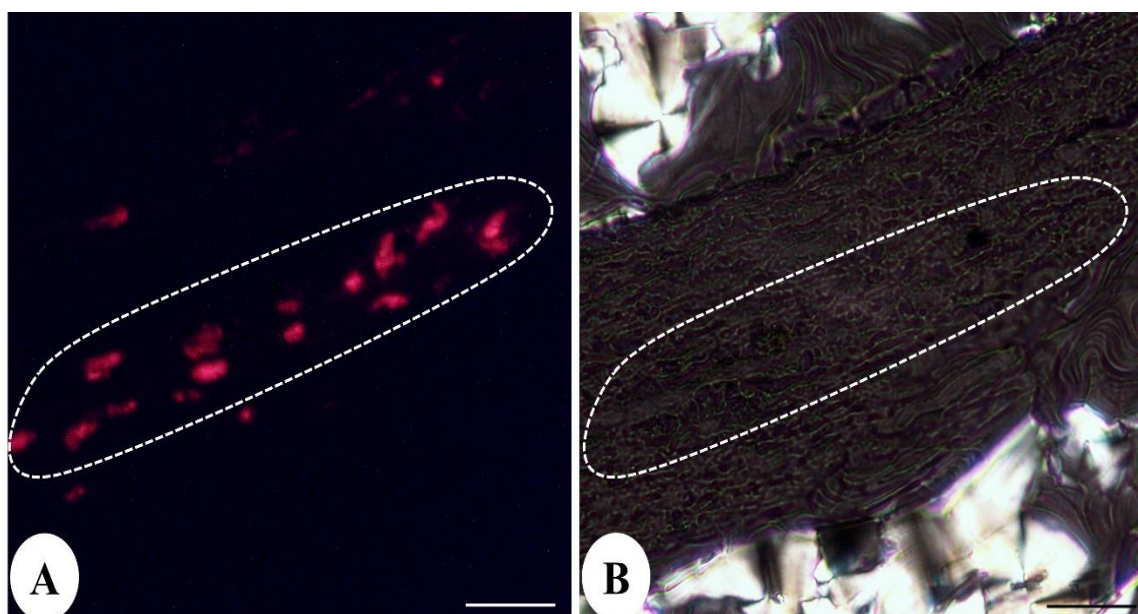


Figura 5. Testículo de híbridos adultos triploides analisada por microscopia de fluorescência, aos 10 dias após o transplante. **A:** Análise por microscopia de fluorescência, onde as linhas ponteadas em branco indicam regiões de espermatogônias marcadas com PKH26. **B:** Linhas ponteadas indicam a região em A onde foram identificadas células PKH26 positivas. **Escala:** A-B:100 μ m.

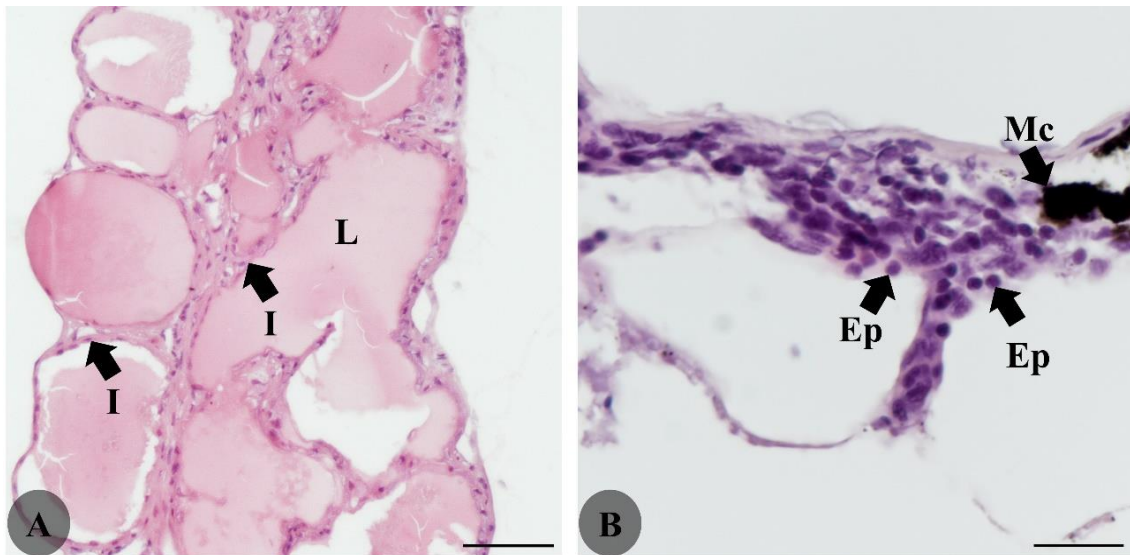


Figura 6. Testículo de híbridos adultos triploides analisada por microscopia óptica, aos 10 dias após transplante. **A:** Testículo do grupo controle desprovido de células germinativas, com presença do lúmen testicular (L) e interstício (I). **B:** Testículo transplantado, as setas indicando células do epitélio germinativo (Ep) e macrófagos (Mc). **Escala:** A: 200 μ m; B: 50 μ m.

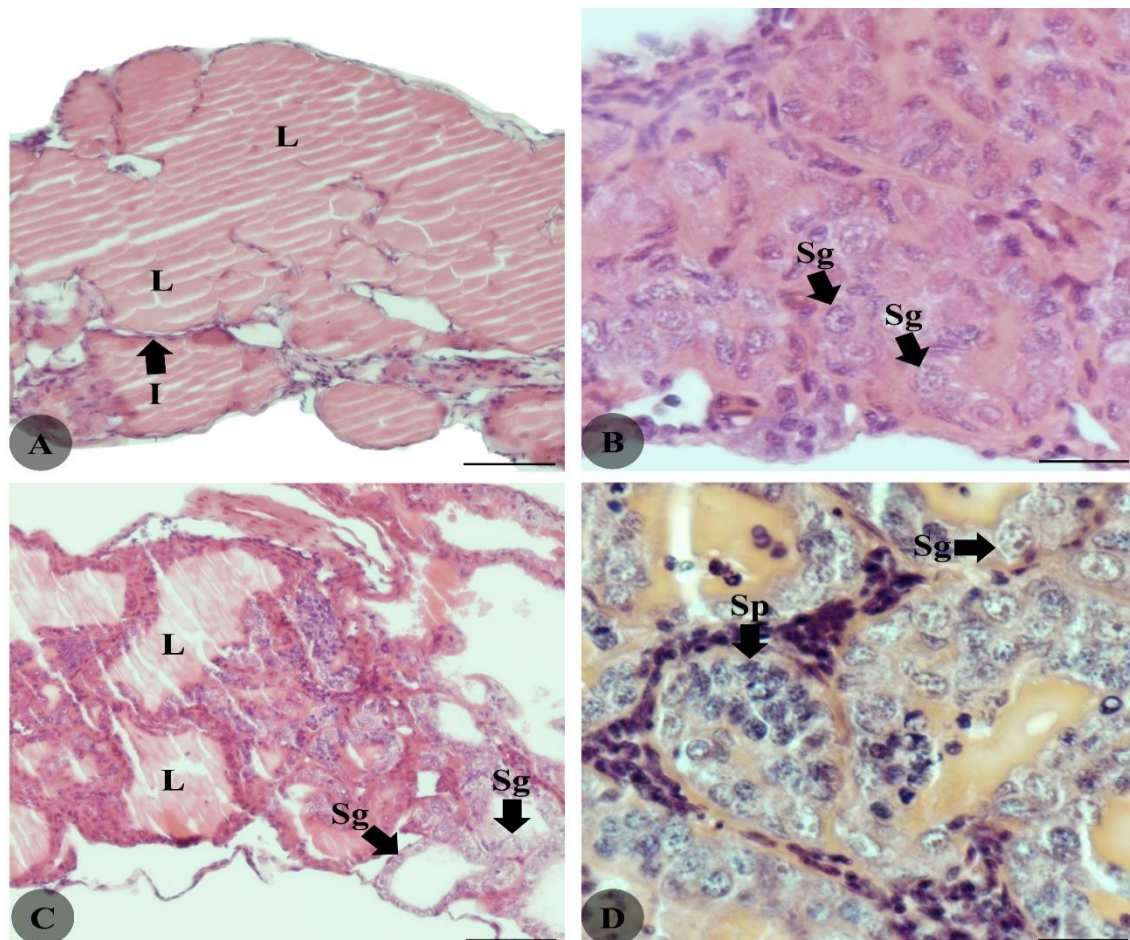


Figura 7. Secção histológica de Testículo de híbridos adultos triploides analisada por microscopia óptica, aos 20 dias após transplante, sendo as lâminas coradas com hematoxilina e eosina. **A:** Testículo do grupo controle sendo observado apenas lúmen testicular e interstício. **B:** Testículo representativo dos transplantes de espermatogônias recém isoladas, com as setas indicando espermatogônias-tronco em processo de proliferação **C:** Testículo de receptor transplantado com células criopreservadas, observando a proliferação e colonização do testículo. **D:** Imagem em maior aumento da região de **C**, sendo identificado espermatogônias e espermátocitos no testículo receptor. Sg: Espermatogônias; Sp: Espermátocitos; I: Interstício; L: Lúmen testicular. **Escala:** A-C: 200 µm; B-D: 50 µm.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba (*B. orbignyanus*) para machos de lambaris “juvenis” triploides, tratados com busulfan, e híbridos adultos triploides foram promissores para a obtenção de quimeras germinativas funcionais. O transplante de espermatogônia-tronco em receptores triploides tratados com busulfan e em híbridos triploides são inéditos e podem ser consideradas estratégias inovadoras na geração de quimeras germinativas, que podem aumentar a eficiência na geração de quimeras germinativas quando comparada com metodologias usuais. Apesar de até o momento não ter sido avaliada a produção de gametas exógenos, bem como a confirmação molecular, alguns receptores machos de lambaris “juvenis” triploides e de híbridos adultos triploides transplantados estão sendo mantidos em aquários para tais avaliações.

Células germinativas PKH26 positivas foram identificadas aos 80 dias após transplante em “juvenis” triploides tratados com busulfan, enquanto que muitas espermatogônias não eram PKH26 positivas. Este fato, pode ter ocorrido por três mecanismos distintos; ou as espermatogônias exógenas estavam se proliferando e perdendo a marcação durante as divisões celulares, ou estava ocorrendo o retorno da gametogênese endógena, ou ainda, ambas hipóteses ocorreram. A utilização de outras metodologias, tais como hibridização *in situ* fluorescente (FISH), hibridização *in situ* (ISH) e imuno histoquímica, utilizando alvos específicos da espécie doadora, pode auxiliar na questão da origem das espermatogônias não marcadas, porém ainda há

dependência de conhecimentos de alvos específicos que diferem entre piracanjuba e lambari, bem como anticorpos espécie-específica. A presença de espermatócitos PKH26 positivos sugerem que eles vieram como contaminantes do processo de purificação, ou as espermatogônias-tronco entraram em processo de diferenciação nos testículos dos receptores, ou ambas hipóteses são verdadeiras. No entanto, foi verificado que os testículos avaliados mais tardiamente após o transplante apresentavam maior número de espermatócitos, sugerindo a ocorrência da diferenciação celular. O fato de ainda não ter presença de espermatozoides no lúmen testicular, aos 80 dias após transplante, nos testículos dos receptores “juvenis” triploides sugere que o processo de colonização e espermatogênese vindos de células exógenas e mais lento que o retorno da gametogênese endógena, necessitando de um período mais prolongado para a avaliação da produção de gametas exógenos.

Nos testículos dos animais híbridos adultos triploides, que foram transplantados com espermatogônias-tronco recém isoladas e criopreservadas, foram visualizadas células PKH26 positiva até os 20 dias após transplante, e por enquanto, não foram avaliadas outras gônadas mais tardiamente. O processo de esterilização utilizando os métodos de hibridação entre espécies e manipulação cromossômica fizeram com que os testículos não apresentassem células germinativas, tornando-os receptores ideais. Desta forma, o desenvolvimento inicial do epitélio germinativo indica que as células transplantadas estavam se proliferando nos testículos, principalmente pela presença de espermatogônias não marcadas, que devem ter perdido a marcação de PKH26 durante as divisões celulares. Comparando os testículos desta coleta com aqueles coletados aos 10 dias após o transplante, pode ser verificado maior número de espermatócitos, sugerindo que possa neste estágio já estar ocorrendo a diferenciação.

Vale ressaltar, que experimentos iniciais realizados com híbridos triploides de lambaris aos 4 meses de idade (dados não apresentados) não foram bem-sucedidos, uma vez que as gônadas eram muito pequenas, além de que não era possível diferenciar entre machos e fêmeas, pois nos machos não era possível identificar a espícula na nadadeira caudal. Portanto, ao ter testículos pequenos dificultava o transplante via papila urogenital, pois as células poderiam ser injetadas no lugar errado. No entanto, aos 10 meses estas gônadas se desenvolveram, permitindo a colonização dos testículos pelas células transplantadas. Diferente dos machos, as fêmeas de híbridos adultos triploides apresentavam células germinativas nos ovários. Este fato indica que a adição de mais um método de esterilização, seja com tratamento com busulfan ou somente alta temperatura, pode possibilitar a produção de receptores fêmeas.

O sucesso do transplante a partir espermatogônias-tronco criopreservadas permitiu avaliar a eficiência da criopreservação na geração de banco genético de células germinativas de piracanjuba. O fato das células germinativas criopreservadas colonizar os testículos de um receptor, que pode ser considerado ideal, possibilita a esquematização de procedimentos que podem ser utilizados na reconstituição da piracanjuba em caso de extinção. Apesar de ainda não ter sido avaliado a produção e gametas exógenos e não ter a obtenção de receptores fêmeas ideais, este trabalho apresenta resultados promissores para a elaboração de procedimentos de reconstituição da piracanjuba. Os procedimentos até aqui bem-sucedido são os primeiros estabelecidos para espécie neotropical, utilizando receptores adultos. Trabalhos utilizando a criopreservação de espermatogônia-tronco e posterior transplante foram realizados em larvas, sendo o transplante via intraperitoneal (Franěk et al., 2019; Octavera and Yoshizaki, 2020; Yoshikawa et al., 2018a), sendo obtidas quimeras germinativas capazes de produzir gametas dos doadores.

O transplante via papila urogenital utilizando espermatogônia-tronco de piracanjuba foi realizado anteriormente, usando como receptores machos diploides de lambari (*A. altiparanae*), chegando a produzir espermatozoides endógenos e exógenos (de Siqueira-Silva et al., 2019). Em outros trabalhos, a espermatogênese foi depletada com tratamento de busulfan e realizado o transplante de espermatogônia-tronco, também foram visualizados espermatozoides endógenos e exógenos (Lacerda et al., 2010; Majhi et al., 2009; Majhi et al., 2014). No entanto, utilizar animais 100% estéreis, como no caso dos híbridos triploides que os testículos são constituídos apenas por células de suporte é vantajoso em relação a esses trabalhos citados, uma vez que a competição por espaço e nutrientes entre células endógenas e exógenas é eliminada (Dobrinski, 2006). Portanto, alguns trabalhos publicados buscaram a produção de receptores completamente desprovidos de células germinativas (Piva et al., 2018; Ponjarat et al., 2019; Yoshikawa et al., 2018b). Utilizando esta estratégia, alguns trabalhos foram bem-sucedidos no transplante de células-tronco, sendo produzidos gametas apenas da espécie doadora (Xu et al., 2019, 2020; Yoshikawa et al., 2018b).

A utilização de lambaris “juvenis” triploides em associação com o tratamento químico por busulfan, pode ser uma estratégia alternativa para produzir receptores estéreis. Apesar de não serem desprovidos de células germinativas, alguns machos triploides produzem espermatozoides, apresentando baixas taxas de fertilização e não sendo observada a sobrevivência dos descendentes (Ferreira Do Nascimento et al., 2017; Takeuchi et al., 2018), além do retorno da espermatogênese parecer ser mais lenta em triploides que em diploides, como discutido no Capítulo 2. Este fato faz com que a hibridação de descendentes entre as espécies doadoras e receptoras seja evitada (Majhi et al., 2009; Lacerda et al., 2010). Portanto, o uso da esterilização química em animais triploides tratados com busulfan seria vantajoso em relação ao uso de animais diploides

usados na esterilização química, sendo uma estratégia interessante para produzir quimeras germinativas. O transplante de células germinativas para embriões e larvas triploides foi realizado com sucesso e as quimeras germinativas produzidas desenvolveram gametogênese normal, chegando a produzir gametas unicamente do indivíduo doador (Saito et al., 2008; Yoshizaki et al., 2010; Iwasaki-Takahashi et al., 2020).

Os resultados obtidos até o momento indicam que a estratégia do uso de lambaris triploides tratados com busulfan, pode ser uma alternativa promissora para o transplante em animais adultos via papila urogenital. Contudo, o transplante em híbridos adultos triploides apresenta várias vantagens sobre os “juvenis” triploides. Pelo fato de serem desprovidos de células germinativas evita a competição entre células endógenas e exógenas e dispensa o uso de marcação das células transplantadas, podendo ser realizadas as análises apenas com coloração de hematoxilina e eosina. Gametas produzidos devem ser apenas da espécie doadora, dispensando o uso de validação molecular. A metodologia é menos laboriosa, evitando as aclimações em diferentes temperaturas, bem como as aplicações de busulfan, sendo o manejo dos animais facilitado e de menor mortalidade. Além disso, dispensa a manutenção exigida em sistema fechado para alta temperatura. No entanto, ela pode ser desvantajosa quanto ao período mais longo de vida do animal para a realização do transplante.

5. CONCLUSÃO

Os trabalhos de isolamento e criopreservação de espermatogônia-tronco e seu posterior transplante via papila urogenital utilizando receptores machos de lambaris “juvenis” triploides tratados com busulfan e híbridos adultos triploides adultos são inéditos, inovadores e promissores para conservação do material genético da piracanjuba (*B. orbignyanus*), estabelecendo procedimentos de reconstituição da piracanjuba em caso de extinção da espécie, através da geração de quimera germinativa.

Apesar de ainda não ter sido avaliado a produção de espermatozoides e a confirmação de sua origem endógena ou exógena, as quimeras germinativas realizadas pelo transplante de espermatogônia-tronco de piracanjuba em receptores esterilizados, utilizando as associações dos métodos de manipulação cromossômica e esterilização química e de hibridação entre espécies e manipulação cromossômica foram obtidas com sucesso, uma vez que evidenciada a colonização e desenvolvimento do epitélio germinativo nos testículos de ambos receptores pela as células transplantadas.

Os transplantes de células germinativas entre os receptores machos de lambaris “juvenis” triploides tratados com busulfan em alta temperatura e em híbridos adultos triploides (*A. altiparanae* e *A. fasciatus*) foram eficientes para geração de quimeras germinativas, no entanto os receptores híbridos adultos triploides são desprovidos de células germinativas e, portanto, são os mais indicados para serem receptores. Além da geração de híbridos adultos triploides ser menos laboriosa que a dos “juvenis triploides.

Os transplantes de células germinativas recém purificadas e criopreservadas foram efetivos quanto ao desenvolvimento do epitélio germinativo nos testículos dos receptores híbridos adultos triploides, validando desta forma a eficácia da criopreservação para constituição de bancos genéticos de piracanjuba. Portanto, a criopreservação das espermatogônias de piracanjuba e seu transplante em nos receptores gerados neste

trabalho, especialmente os híbridos adultos triploides, constituem procedimentos, aqui determinados, de grande valia para geração de quimeras germinativas de piracanjuba a serem empregadas como medidas conservacionistas e de reconstituição de espécies.

6. REFERÊNCIAS

- Adamov, N.S. de M., Nascimento, N.F. do, Maciel, E.C.S., Pereira-Santos, M., Senhorini, J.A., Calado, L.L., Evangelista, M.M., Nakaghi, L.S.O., Guerrero, A.H.M., Fujimoto, T., Yasui, G.S., 2017. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 48, 741–750. <https://doi.org/10.1111/jwas.12390>
- 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, 68–74. <https://doi.org/10.1111/are.13433>
- de Siqueira-Silva, D.H., dos Santos Silva, A.P., da Silva Costa, R., Senhorini, J.A., Ninhaus-Silveira, A., Veríssimo-Silveira, R., 2019. Preliminary study on testicular germ cell isolation and transplantation in an endangered endemic species *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae). *Fish Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00631-8>
- Dobrinski, I., 2006. Transplantation of germ line stem cells for the study and manipulation of spermatogenesis. Ernst Schering Research Foundation workshop 175–193. https://doi.org/10.1007/3-540-31437-7_12

- Ferreira Do Nascimento, N., De Siqueira-Silva, D.H., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Senhorini, J.A., Nakaghi, L.S.O., Yasui, G.S., 2017. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote* 25, 537–544. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000399>
- Franěk, R., Marinović, Z., Lujić, J., Urbányi, B., Fučíková, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Horváth, Á., 2019. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLoS ONE* 14, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205481>
- Iwasaki-Takahashi, Y., Shikina, S., Watanabe, M., Banba, A., Yagisawa, M., Takahashi, K., Fujihara, R., Okabe, T., Valdez, D.M., Yamauchi, A., Yoshizaki, G., 2020. Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout. *Communications biology* 3, 308. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1025-y>
- Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R., Costa, G.M.J., Segatelli, T.M., Quirino, B.R., Queiroz, B.M., Kalapothakis, E., França, L.R., 2010. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PLoS ONE* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010740>
- Majhi, S.K., Hattori, R.S., Rahman, S.M., Strüssmann, C.A., 2014. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095294>
- Majhi, S.K., Hattori, R.S., Yokota, M., Watanabe, S., Strüssmann, C.A., 2009. Germ cell transplantation using sexually competent fish: An approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. *PLoS ONE* 4, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006132>

- Octavera, A., Yoshizaki, G., 2020. Production of Chinese rosy bitterling offspring derived from frozen and vitrified whole testis by spermatogonial transplantation. *Fish Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00802-y>
- Piva, L.H., de Siqueira-Silva, D.H., Goes, C.A.G., Fujimoto, T., Saito, T., Dragone, L.V., Senhorini, J.A., Porto-Foresti, F., Ferraz, J.B.S., Yasui, G.S., 2018. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? *Theriogenology* 108, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.013>
- Ponjarat, J., Singchat, W., Monkheang, P., Suntronpong, A., Tawichasri, P., Sillapaprayoon, S., Ogawa, S., Muangmai, N., Baicharoen, S., Peyachoknagul, S., Parhar, I., Na-Nakorn, U., Srikulnath, K., 2019. Evidence of dramatic sterility in F₁ male hybrid catfish [male *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) × female *C. macrocephalus* (Günther, 1864)] resulting from the failure of homologous chromosome pairing in meiosis I. *Aquaculture* 505, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.035>
- Saito, T., Goto-kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 166, 159–166. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060038>
- Takeuchi, Y., Yatabe, T., Yoshikawa, H., Ino, Y., Kabeya, N., Yazawa, R., Yoshizaki, G., 2018. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock. *Aquaculture* 494, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.030>

- Xu, D., Yoshino, T., De Bello Cioffi, M., Yoshikawa, H., Ino, Y., Yazawa, R., Lacerda, S.M.D.S.N., Takeuchi, Y., 2020. Production of donor-derived eggs after ovarian germ cell transplantation into the gonads of adult, germ cell-less, triploid hybrid fish. *Biology of Reproduction* 103, 1289–1299. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa168>
- Xu, D., Yoshino, T., Konishi, J., Yoshikawa, H., Ino, Y., Yazawa, R., Dos Santos Nassif Lacerda, S.M., De França, L.R., Takeuchi, Y., 2019. Germ cell-less hybrid fish: Ideal recipient for spermatogonial transplantation for the rapid production of donor-derived sperm. *Biology of Reproduction* 101, 492–500. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz045>
- 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* 39, 464–470. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002511>
- Yoshikawa, H., Ino, Y., Shigenaga, K., Katayama, T., Kuroyanagi, M., Yoshiura, Y., 2018a. Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technology. *Aquaculture* 493, 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.016>
- Yoshikawa, H., Xu, D., Ino, Y., Yoshino, T., Hayashida, T., Wang, J., Yazawa, R., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., 2018b. Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells. *Genetics* 209, 507–521. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300777>
- Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., Okutsu, T., 2010. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development* 137, 1227–1230. <https://doi.org/10.1242/dev.044982>

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi evidenciado que o sucesso na geração de quimeras germinativas depende de vários fatores. A coleta das gônadas em animais adultos deve ser realizada em período adequado da espermatogênese, quando as células germinativas estão se proliferando, propiciando maior pureza das espermatogônias-tronco, além de possíveis efeitos positivos na colonização das gônadas dos receptores devido ao estágio de alta proliferação que estas células se encontram. A criopreservação e transplante das espermatogônias-tronco devem ser realizados utilizando a etapa de purificação no qual as características intrínsecas de células-tronco germinativas são preservadas. Os testículos dos receptores devem estar bem desenvolvidos para que a colonização das gônadas seja efetiva, e o receptor ideal é aquele que não apresenta células germinativas endógenas, ou o retorno da espermatogênese endógena deve ser muito lento, para permitir a colonização pela célula exógena, e ainda a produção de gametas endógenos deve ser muito baixa e de baixa fecundidade.

O estabelecimento de procedimentos de criopreservação de células germinativas e de obtenção de receptores ideais são etapas essenciais para aplicação de ações conservacionistas e de reconstituição de espécies.

Futuros trabalhos de transplantes de espermatogônias-tronco devem ser realizados nos receptores gerados neste trabalho, para a avaliação da produção de espermatozoides e a confirmação da origem dos espermatozoides (endógeno, exógeno ou ambos) utilizando técnicas moleculares. Além do uso do sêmen provenientes das quimeras germinativas para a fecundação de ovos de piracanjuba e a análise dos descendentes.

Apesar de terem sido obtidos resultados promissores na esterilização de fêmeas de lambaris juvenis triploides, ainda é necessário a continuidade deste trabalho para

obtenção de fêmeas de lambaris triploides estéreis. Devido a susceptibilidade que as fêmeas juvenis triploides apresentaram às sucessivas aplicações de busulfan, variações da metodologia podem ser empregadas, como a diminuição da concentração de busulfan e aumento do número de dosagens. Além disso, foi verificado que a exposição das fêmeas juvenis triploides, do grupo controle sem aplicação de busulfan, a temperatura alta foi capaz de regredir os ovários. Alternativamente, o busulfan poderia ser dispensado e o uso de temperatura alta em outras etapas do desenvolvimento, como em larvas ou no período de diferenciação sexual, poderia trazer resultados interessantes quanto a esterilização completa das fêmeas. Estes mesmos procedimentos poderiam ser aplicados em híbridos adultos triploides para tentar obter ovários sem células germinativas. Experimentos de esterilização química em fêmeas de híbridos juvenis triploides devem ser realizados e comparados com os resultados obtidos com lambaris juvenis triploides.

Apesar ter sido realizado o experimento de esterilização de fêmeas de juvenis triploides, o transplante ainda não foi realizado. Este procedimento, bem como as análises de colonização devem ser realizados para saber da eficácia desta metodologia. A obtenção de fêmeas completamente estéreis é um passo importante para consolidar os procedimentos de quimerismo em piracanjuba, visando a aplicação em ações conservacionistas e de reconstituição desta espécie.