

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/04/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)

São Paulo State University-Aquaculture Center



Androgênese em *Astyanax altiparanae*:

Ferramenta de Reconstituição em Peixes

Matheus Pereira dos Santos

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

Co - Orientador: Dr. George Shigueki Yasui

JABOTICABAL - SP
2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)

São Paulo State University-Aquaculture Center



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

Matheus Pereira dos Santos

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

Coorientador: Dr. George Shigueki Yasui

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

**JABOTICABAL – SP
2017**

Santos, Matheus Pereira dos

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

xix, 175 p. : il. ; 29 cm

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

Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi

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

Bibliografia

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

CDU 639.3.03



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

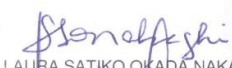
Unidade Complementar - Jaboticabal

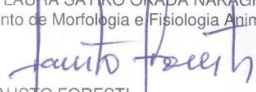
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

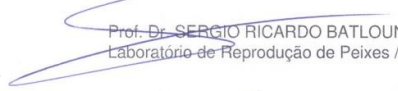
TÍTULO DA TESE: Androgênese em *Astyanax altiparanae*: Ferramenta de Reconstituição em Peixes.

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

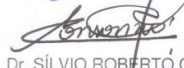
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


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


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


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


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


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

Jaboticabal, 25 de abril de 2017

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

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

Agradecimentos

Pessoas que fizeram parte da minha trajetória

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Equipes e Instituições

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sumário

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

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

Lista de Figuras

Capítulo I

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

Figura 2: Oócitos de *Astyanax altiparanae* estocados por 60 minutos (A), 120 minutos (B), 180 minutos (C) e 240 minutos (D) pós extrusão. Asteriscos indicam oócitos com hidratação parcial ou total durante a estocagem; setas destacam alterações morfológicas na estrutura dos oócitos. Barra de escala: 100 μm60

Figura 3: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae*. Oócitos fertilizados imediatamente após a extrusão (controle) nos estágios de blástula, gástrula e segmentação (A, B, C). Embriões cujos oócitos foram fertilizados 60 minutos após a extrusão (D, E, F); 120 minutos após a extrusão (G,H, I); 180 minutos após a extrusão (J, K, L) e 240 minutos após a extrusão (M, N, O). Asteriscos indicam malformações durante as divisões celulares da blastoderme, setas indicam células desprendidas dos embriões, setas brancas indicam malformações durante a gastrulação, estrelas destacam malformações na conformação do vitelo, triângulo indica malformações na região cefálica e círculos representam malformações na região caudal. Barra de escala: 100 μm61

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

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

Capítulo II

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

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

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

Figura 4: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, cujos oócitos foram fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C) e cujos oócitos foram fertilizados após 120 minutos de extrusão em três soluções: dPBS (D, E, F), Hanks (G, H, I) e Ringer (J, K, L). Setas indicam células que se desprenderam dos embriões. Asteriscos destacam malformações durante os movimentos de epibolia. Meia lua aponta ausência de espaço perivitelino. Estrelas destacam malformações na blastoderme e o triângulo indica malformação de coluna. Barra de escala: 100 μm95

Figura 5: Embriões de *Astyanax altiparanae* nos estágios de segmentação e eclosão. Embrião que não foram expostos à irradiação (controle) (A, B); embriões cujos oócitos foram irradiados por 30 segundos (C, D); embriões cujos oócitos foram irradiados por 60 segundos (E, F); embriões cujos oócitos foram irradiados por 90 segundos (G, H) e embriões cujos oócitos foram irradiados por 120 segundos e posteriormente fertilizados (I, J). Asteriscos indicam malformações na cauda; setas finas apontam padrão anormal de diferenciação do vitelo; setas grossas destacam diferenciação cranial anormal e estrelas a malformação e distribuição de vitelo. Barra de escala: 100 μm101

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

totalmente fundidos (C) e ovos com doze minutos pós fertilização fusionados (D). Setas indicam a localização dos pronúcleos. Barra de escala: 100 μ m.....102

Capítulo III

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

Figura 2: Desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* nos estágios de blástula, gástrula e segmentação, cujos oócitos foram fertilizados imediatamente após a extrusão (A, B, C); cujo córion do oócito foi removido antes da fertilização (D, E, F); cujo oócito foi irradiado e posteriormente fertilizado (G, H, I) e cujo oócito foi irradiado, com remoção do córion, e posteriormente fertilizado (J, K, L), nos estágios de blástula (J), gástrula (K) e segmentação (L). Asteriscos destacam malformações na região de diferenciação da cauda, setas apontam para deformidades na região cranial, estrelas indicam células se desprendendo do embrião em divisão, círculos destacam mal conformação no vitelo, triângulo aponta para um número reduzido de somitos no mesmo período de incubação, quadrado destaca malformações nos movimentos de epibolia do estágio de gástrula e losango indica malformações nas divisões celulares da blastoderme. Barra de escala: 100 μ m.....131

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

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

Capítulo IV

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

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

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

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

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

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

Lista de Tabelas**Capítulo I**

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

Capítulo II

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

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

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

Capítulo III

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

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

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

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

Capítulo IV

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

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

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

Resumo Geral

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

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

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

General Abstract

Androgenesis is uniparental reproductive mechanism in which the offspring presents exclusively paternal inheritance. The technique can be used as a strategy for the conservation of endangered species by chromosome manipulation. The present work was developed with the purpose of establishing protocols for induction of dispermic androgenesis in *Astyanax altiparanae*, establishing a set of procedures for chromosome manipulation. Initially, it was established whether the storage time of the oocytes affected its viability and its ploidy. The results indicate that a storage above 60 minutes after extrusion can affect the ploidy, viability and survival, with 4.44% of the analyzed samples being triploids. Considering this information, a culture medium for the oocytes after extrusion and the ideal range of UV irradiation were later established in order to inactivate the maternal genome. The best solution oocyte storage was dPBS, which maintained the oocytes more than 120 minutes, allowing a wide range for manipulation. In this treatment, the hatching rate was $92.08 \pm 1.75\%$. The most effective irradiation range to inactivate maternal genome was 90 mW / cm², with 100% of analyzed samples as haploid. With the establishment of this protocol, the first trials for induction of dispermic androgenesis became feasible. A protocol of oocyte irradiation and fertilization with semen of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* and albino *Hyphessobrycon anisitsi*, with removal of the chorion from oocytes with pronase, was established to facilitate fertilization by more than one spermatozoa. 100% of the UV

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

Introdução Geral

1. Espécies experimentais

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

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

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

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

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

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

Considerações Finais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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