

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 18/07/2018.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
(CAUNESP)**



# **Rastreabilidade de células germinativas primordiais (CGPs) e micromanipulação em duas espécies de peixes teleósteos**

**Regiane Cristina da Silva  
Bióloga**

**Jaboticabal - São Paulo  
2016**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
(CAUNESP)**



# **Rastreabilidade de células germinativas primordiais (CGPs) e micromanipulação em duas espécies de peixes teleósteos**

**Doutoranda: Regiane Cristina da Silva**

**Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi**

**Coorientador: Dr. George Shigueki Yasui**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

**Jaboticabal - São Paulo**

**2016**

S586r Silva, Regiane Cristina da  
Rastreabilidade de células germinativas primordiais (CGPs) e micromanipulação em duas espécies de peixes teleósteos / Regiane Cristina da Silva. – – Jaboticabal, 2016  
xiv, 138 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2016

Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi

Coorientador: George Shigueki Yasui

Banca examinadora: Sérgio Fonseca Zaiden, Rafael Henrique Nóbrega, Flávio Vieira Meirelles, Luciano Andrade Silva  
Bibliografia

1. Ontogenia. 2. Transplante. 3. Biotecnologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: regianesilva\_bio@yahoo.com.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Rastreabilidade de células germinativas primordiais (CGPs) e micromanipulação em duas espécies de peixes teleósteos

**AUTORA:** REGIANE CRISTINA DA SILVA

**ORIENTADORA:** LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

**CO-ORIENTADOR:** GEORGE SHIGUEKI YASUI

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

Prof. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Departamento de Morfol e Fisiol Animal / Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias de Jaboticabal

Prof. Dr. SÉRGIO FONSECA ZAIDEN

FUNDAÇÃO DE ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE

Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NOBREGA

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES

Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA/USP

Prof. Dr. LUCIANO ANDRADE SILVA

Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA/USP

Jaboticabal, 18 de julho de 2016.

## Sumário

|                                                                                                                                                                    |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Dedicatória .....                                                                                                                                                  | ii     |
| Homenagem Especial.....                                                                                                                                            | iii    |
| Agradecimento Especial .....                                                                                                                                       | iv     |
| Agradecimentos.....                                                                                                                                                | v      |
| Apoio financeiro .....                                                                                                                                             | ix     |
| Lista de Figuras .....                                                                                                                                             | x      |
| Lista de Tabelas.....                                                                                                                                              | xiv    |
| Resumo Geral .....                                                                                                                                                 | 1      |
| General Abstract .....                                                                                                                                             | 3      |
| 1. Introdução geral.....                                                                                                                                           | 5      |
| 2. Objetivo Geral .....                                                                                                                                            | 8      |
| 2.1 Objetivos específicos .....                                                                                                                                    | 8      |
| 3. Justificativa .....                                                                                                                                             | 8      |
| 4. Contextualizações .....                                                                                                                                         | 10     |
| 4.1 Potencial do Brasil para a aquicultura .....                                                                                                                   | 10     |
| 4.2 Reflexos da ação antrópica sobre as espécies de peixes nativos.....                                                                                            | 13     |
| 4.3 Família Characidae .....                                                                                                                                       | 14     |
| 4.3.1 O Gênero Brycon .....                                                                                                                                        | 14     |
| 4.3.2 <i>Brycon amazonicus</i> (espécie doadora) .....                                                                                                             | 15     |
| 4.3.3 <i>Astyanax altiparanae</i> (espécie receptora) .....                                                                                                        | 16     |
| 4.4 Desenvolvimento inicial em peixes .....                                                                                                                        | 18     |
| 4.5 Células Germinativas Primordiais (CGPs) .....                                                                                                                  | 22     |
| 4.5.1 Identificação e rastreabilidade de CGPs .....                                                                                                                | 24     |
| 4.6 Quimerismo .....                                                                                                                                               | 26     |
| 4.7 Criopreservação e protetores celulares .....                                                                                                                   | 29     |
| 5. Referências .....                                                                                                                                               | 34     |
| <br>ARTIGO 1: Manipulação da temperatura sob o desenvolvimento inicial de <i>Brycon amazonicus</i> Spix & Agassiz, 1829 como ferramenta para a biotecnologia ..... | <br>48 |
| Resumo.....                                                                                                                                                        | 48     |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abstract .....                                                                 | 49 |
| 1. Introdução .....                                                            | 50 |
| 2. Material e Métodos .....                                                    | 51 |
| 2.1 Reprodutores e reprodução induzida para obtenção dos gametas.....          | 51 |
| 2.2 Amostras e tempo de amostragens .....                                      | 52 |
| 2.3 Observação dos pronúcleos.....                                             | 53 |
| 2.4 Classificação do desenvolvimento inicial de <i>Brycon amazonicus</i> ..... | 53 |
| 2.5 Análise morfométrica .....                                                 | 54 |
| 2.6 Análise estatística.....                                                   | 54 |
| 3. Resultados .....                                                            | 55 |
| 3.1 Zigoto.....                                                                | 55 |
| 3.2 Clivagem .....                                                             | 56 |
| 3.3 Blástula .....                                                             | 56 |
| 3.4 Gástrula .....                                                             | 57 |
| 3.5 Segmentação.....                                                           | 57 |
| 3.6 Eclosão.....                                                               | 59 |
| 3.7 Desenvolvimento após a eclosão .....                                       | 60 |
| 4. Discussão .....                                                             | 61 |
| 5. Conclusão .....                                                             | 64 |
| 6. Considerações Finais .....                                                  | 64 |
| 7. Agradecimentos .....                                                        | 64 |
| 8. Referências .....                                                           | 77 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ARTIGO 2: Protocolo de micromanipulação, criopreservação e observação de células germinativas primordiais (CGPs) em <i>Astyanax altiparanae</i> Garutti & Britski, 2000 ..... | 81 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo.....                                                                          | 81 |
| Abstract .....                                                                       | 82 |
| 1. Introdução .....                                                                  | 83 |
| 2. Material e Métodos .....                                                          | 85 |
| 2.1 Reprodução e manejo dos ovos.....                                                | 85 |
| 2.2 Remoção enzimática do córion e solução para incubação de ovos decorionados ..... | 86 |
| 2.3 Isolamento e criopreservação de blastômeros.....                                 | 87 |
| 2.4 Síntese de mRNA.....                                                             | 88 |
| 2.5 Microinjeção de mRNA.....                                                        | 88 |

|                                                       |     |
|-------------------------------------------------------|-----|
| 2.6 Análise histológica.....                          | 89  |
| 2.7 Análise estatística.....                          | 89  |
| 3. Resultados .....                                   | 89  |
| 3.1 Decorionação de ovos .....                        | 89  |
| 3.2 Solução para incubação de ovos decorionados ..... | 90  |
| 3.3 Isolamento e criopreservação de blastômeros.....  | 91  |
| 3.4 Visualização das CGPs.....                        | 91  |
| 4. Discussão .....                                    | 93  |
| 5. Conclusões.....                                    | 96  |
| 6. Considerações Finais .....                         | 96  |
| 7. Agradecimentos .....                               | 97  |
| 8. Referências .....                                  | 105 |

|                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Artigo 3 ( <i>Short Communication</i> ): Rastreabilidade de células germinativas primordiais (CGPs) <i>in vivo</i> usando GFP- <i>nos1</i> 3'UTR mRNA em <i>Brycon amazonicus</i> (Spix & Agassiz 1829) ..... | 110 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| Resumo.....                 | 110 |
| Abstract .....              | 111 |
| 1. Introdução .....         | 112 |
| 2. Material e Métodos ..... | 113 |
| 3. Resultados .....         | 114 |
| 4. Discussão .....          | 115 |
| 5. Conclusões.....          | 116 |
| 6. Agradecimentos .....     | 116 |
| 7. Referências .....        | 118 |

|                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ARTIGO 4: Produção de quimera germinativa utilizando <i>Astyanax altiparanae</i> Garutti & Britski, 2000 como modelo biológico: uma alternativa para preservação de espécies ameaçadas de extinção ..... | 120 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Resumo.....                                                                                                                            | 120 |
| Abstract .....                                                                                                                         | 121 |
| 1. Introdução .....                                                                                                                    | 122 |
| 2. Material e Métodos .....                                                                                                            | 124 |
| 2.1 Obtenção de ovos de <i>Brycon amazonicus</i> e <i>Astyanax altiparanae</i> .....                                                   | 124 |
| 2.2 Preparação dos embriões para o transplante de blastômeros e microinjeção de FITC para marcação das células do embrião doador ..... | 125 |

|                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.3 Desenvolvimento embrionário e transplante celular durante o estágio de blástula..... | 125 |
| 2.4 Análise estatística.....                                                             | 126 |
| 3. Resultados .....                                                                      | 127 |
| 4. Discussão .....                                                                       | 128 |
| 5. Conclusões.....                                                                       | 129 |
| 6. Considerações Finais .....                                                            | 129 |
| 7. Agradecimentos .....                                                                  | 130 |
| 8. Referências .....                                                                     | 135 |
| Anexos.....                                                                              | 138 |
| Anexo 1.....                                                                             | 138 |

***Terminar o doutorado não foi fácil, mas o aprendizado fez valer a pena!***

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.*

*Mahatma Gandhi*

## DEDICATÓRIA

**Dedico esta tese...**

**...À minha família!**

À minha mãe, Claudete Cune da Silva, por ser fonte de luz, fé e coragem. Apoiando-me e incentivando-me com o espírito repleto de amor, acreditando em mim em todos os momentos! Mãe você é meu porto seguro, exemplo de dedicação e amor!

A memória do meu Pai, José Nivaldo da Silva, que brilhando no céu, me proporcionou força para alcançar meus objetivos durante esta jornada. Pai você está sempre em meus pensamentos e levo seus ensinamentos em meu coração!

À minha irmã, Cristiane da Silva, e ao meu cunhado, Mike Wilson Pinto, por sempre estarem presentes na minha vida, proporcionando-me momentos de alegria e sempre me dando o maior apoio para finalizar esta jornada!

Ao meu irmão, Ederson A. da Silva, e à minha cunhada, Valéria Cristina de O. Franco Silva, pelos momentos de descontração e pelo carinho depositados a mim!

Ao meu noivo Samuel dos Reis Junior pelo carinho e companheirismo! Pela paciência exercida durante os momentos de minha ausência, pela sua presença durante os dias difíceis que os tornaram em dias mais felizes e pela valiosa ajuda que tanto contribuiu para finalização deste trabalho! Amo você!!!

*Família...*

*“Às vezes Deus acerta tanto que a gente nem sabe como agradecer”.*

*Flora Figueiredo*

## HOMENAGEM ESPECIAL

**À profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi...**

Agradecer é tão pouco, quando comparado o que fez por mim!

Agradeço a paciência, o entusiasmo, a compreensão e o carinho!

Quanto aprendizado e quanta alegria!

Você é um exemplo de professora e pesquisadora dedicada e ética!

Com a sua excelência conseguiu fazer-me criar, recriar, começar e recomeçar!

Obrigada professora e orientadora Laura pela persistência, pela vontade de querer nos fazer pessoas melhores, pela transmissão do conhecimento, pela dedicação e por plantar a esperança de dias melhores!

Obrigada por me oferecer a bagagem mais preciosa: os ensinamentos para a vida!

Hoje posso dizer:

– Sou uma pequena semente, semeada por uma professora, mestre e doutora que apesar de títulos tem muito de mãe!

Serei eternamente grata.

*“Se longe alcancei, foi porque segui passos de gigantes”.*

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

**Ao Dr. George Shigueki Yasui...**

Agradeço pelo excelente trabalho que fez em minha vida profissional e pessoal, transformando-me um profissional capaz e forte!

Por ter sido um coorientador com excelente didática e que ensinando os assuntos mais difíceis você fez-me entender com facilidade!

Você ensinou-me, treinou-me e deixou-me a vontade para trabalhar em um laboratório bem equipado e rico de tanta informação!

Foi você quem me deu a chance de olhar a vida sobre um novo horizonte, buscando cada dia o conhecimento através de esforço e dedicação!

Que Deus te ilumine sempre para continuar esta jornada!

Agradeço pela compreensão, dedicação e ensinamentos!

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.*

*Cora Coralina*

## AGRADECIMENTOS

Neste pedaço de papel registro meu sentimento de gratidão a todos que colaboraram com esta pesquisa e pela convivência que trouxe cada dia, um aprendizado! Agradeço os familiares, amigos, professores, técnicos, estagiários, colaboradores e a todos aqueles que de alguma forma estiveram presente em minha vida.

Ao Deus que sempre me ilumina, abençoa, motiva e capacita para tudo àquilo que Ele me destina.

À minha família que é meu alicerce, fonte de fé e luz.

À família Reis, que me acolheu com carinho, me proporcionando alegria e motivação!

Aos companheiros do laboratório do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA/ICMBio), Pirassununga-SP, que ganhei no decorrer destes anos. À Letícia Veroni Dragone, Diógenes Henrique de Siqueira Silva, Lucas Henrique Piva, Matheus Tonetti Galeni, Nycolas Levy Pereira, Nivaldo Ferreira do Nascimento, Paulo André de Andrade Santos, Rafaela Manchin Bertolini, Mariana Florencio Marques, Mariana Evangelista Machado, Matheus Pereira dos Santos, Natália Greice Matheus, Kelly Afonsina Fernandes e Leonardo Luiz Calado.

Ao Dr. George Shigueki Yasui pela orientação, ensinamentos e persistência. E também, pelo suporte e equipamentos disponibilizados a mim, para a realização desta pesquisa!

Ao ilustre pesquisador e amigo Dr. José Augusto Senhorini pelo acolhimento, ensinamentos e disponibilização do material biológico, espaço físico e alojamento. Agradeço por transmitir seus ensinamentos que contribuíram para minha vida profissional e para a realização desta pesquisa!

Aos amigos Nilva, Claudine, Rozilene, Manuel, Sebastião pela amizade e por alegrarem os meus dias de estadia no alojamento do CEPTA/ICMBio em Pirassununga-SP. E aos queridos amigos Rose e Amarildo pelo acolhimento e carinho que me receberam em sua casa!

A todos os funcionários do CEPTA/ICMBio, em especial à “Ritinha”, Paulo Ceccarelli, Ricardo “Gordo”, Noel e Dalton que além de profissionais se tornaram grandes amigos!

Ao colega Rafael da Silva Costa que muitas vezes deixou seus afazeres para me ajudar na captura e seleção dos reprodutores utilizados nesta pesquisa!

Aos amigos de jornada do Laboratório de Morfologia e Embriologia Animal da UNESP, Jaboticabal-SP, Fernanda Nogueira Valentin, Maria do Carmo Faria Paes, Francine Faustino T. Costa, Sheryll J. Corchuelo Chavarro, Frederico Finardi, Breno Manzini, obrigada pela amizade, dedicação e carinho.

Aos colegas e histotécnicos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal-SP, Sr. Orandi Mateus e Edmar Delegá da Silva pelas horas de dedicação para obtenção de bons cortes histológicos como também pelos momentos de alegria e experiências transmitidas.

Aos amigos da república Balalaika, Maria do Carmo F. Paes, Fernanda N. Valentin, Andrea C. Scarpa Bosso e José Roberto F. Alves Junior (Betinho), pelo acolhimento, amizade, incentivo e pela presença em todos os momentos bons e não tão bons assim, rs!

À caríssima amiga Francine Faustino T. Costa pelo laço de amizade, carinho, conselhos e auxílio que foram tão importantes para a finalização do doutorado!

À Fernanda N. Valentin e Maria do Carmo F. Paes por se tornarem irmãs de coração, mostrando-me com desvelo sempre o melhor caminho a trilhar! Levarei vocês no coração!

À caríssima amiga Leticia Hayashi Higuchi pelos inesquecíveis momentos de diversão e convivência.

Ao querido amigo e tão dedicado Doutor José Roberto Ferreira Alves Júnior (Betinho) pelos momentos alegres e de sustos (rs); servindo sempre como exemplo de dedicação!

Aos amigos e companheiros, Adriana Bordignon e Christian Flaker pelas alegrias compartilhadas. Vocês são amigos inesquecíveis!

À querida amiga Fernanda Penão que hoje brilha no céu! Fer, você me fez repensar no que realmente vale a pena nesta breve vida terrena e em muitos momentos você foi minha inspiração! Sentirei muita saudade das nossas conversas e risadas! Descanse em paz.

À amiga, Natália Leitão, que não hesitou em me ajudar nos testes de colorações das lâminas. Obrigada pela dedicação e amizade!

A amiga colombiana Adriana Soliris Corredor Castillo pelo carinho, companheirismo, e pelas estadias na sua tão alegre casa e pelos inúmeros momentos de alegria! Podemos estar em países diferentes, mas nossos corações sempre estarão unidos! E ao caro amigo André

Luiz Veiga Conrado pelas noites de pizza (rs), pelo auxílio nas análises estatísticas e trocas de experiências durante as análises histológicas.

Aos amigos do CAUNESP, em especial, à Iara, Valéria, Rafael, Milene, Patrick, Daniel (Xina), Vito, Paulo, Bruno, Daniel que fizeram das aulas divertidas, dos churrascos alegres e da convivência inesquecível!

As caríssimas amigas Mariana Marques (Mari), Liliane Maria (Lili) e Viviane (Vivi) que me acolheram com carinho na Rep. e se tornaram grandes amigas! Obrigada meninas.

Ao Valdecir F. de Lima que sempre se prontificou em me ajudar, tornando os dias divertidos e cheios de aprendizado!

A todos os professores, alunos e funcionários do CAUNESP. Em especial, à Veralice Cappatto e ao David Oliveira Lorente por serem prestativos, atenciosos e dedicados!

Ao prof. Dr. João Ademir de Oliveira do Departamento de Ciências Exatas pela dedicação e enorme contribuição nas análises estatísticas.

À Arina L. Rochetti (Nina) e Fabiana F. Bressan (Martini) da USP, Pirassununga-SP, pela amizade e pelo auxílio nas etapas laboratoriais que foram fundamentais para realização deste trabalho!

Ao prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni pela disponibilidade em participar da minha banca de qualificação, contribuindo muito em minha tese e minha carreira profissional. Muito obrigada!

Ao Dr. Rafael Yutaka Kuradomi por disponibilizar seu tempo para minha banca de qualificação, contribuindo grandemente com suas sugestões na tese e nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Sérgio Fonseca Zaiden que veio de tão longe para estar presente na banca de defesa do meu doutorado, agradecendo-me com suas importantes sugestões.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega pela imensa contribuição nesta referida tese, a qual enriqueceu grandiosamente.

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles por mostrar-me novos horizontes e pela ilustre presença que muito contribuiu para minha formação.

Ao Prof. Dr. Luciano Andrade Silva que me fez pensar e repensar sobre as técnicas utilizadas nesta tese e pelas inúmeras considerações, que foram muito proveitosas.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA/ICMBio), Pirassununga-SP, pelo fornecimento do material biológico, instalações, equipamentos e todo suporte para esta pesquisa. Em especial, aos pesquisadores e funcionários que contribuíram com sugestões e fizeram da minha estadia um momento de alegre convivência.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) por possibilitar o meu enriquecimento acadêmico na área de Aquicultura e pela oportunidade.

À Universidade de São Paulo (USP), campus de Pirassununga-SP, por disponibilizar instalações e equipamentos que foram fundamentais para a conclusão desta pesquisa!

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma contribuíram para o meu aperfeiçoamento espiritual e intelectual!

*“As pessoas entram em nossas vidas por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem”.*

*Lilian Tonet*

Agradeço, em especial, aos “peixes” que contribuíram com esta pesquisa cedendo com suas vidas!

*“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana”.*

*Charles Darwin*



*“O tempo deixa perguntas, mostra respostas, esclarece dúvidas,  
mas, acima de tudo, o tempo traz verdades”.*

*Autor desconhecido*

## APOIO FINANCEIRO

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido a mim em forma de Bolsa de Doutorado (Processo n. 140633/2013-8).

Sou grata também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio outorgado em forma de bolsa Jovem Pesquisador fornecida ao coorientador do projeto proporcionando suporte necessário para a realização esta pesquisa (Processo n. 2010/17429-1).



*"A saúde do nosso planeta, a nossa própria saúde e a nossa segurança alimentar futura dependem da maneira como lidamos com o mundo azul".*

*José Graziano da Silva*

## LISTA DE FIGURAS

### Contextualização

- Fig. 1. Comparação da disponibilidade de água doce e produção aquícola entre diversos países. Fonte: MPA, 2015.....10
- Fig. 2. Exemplar adulto de *Brycon amazonicus* (matrinxã). Fonte: arquivo pessoal.....15
- Fig. 3. Exemplar adulto de *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo). Fonte: arquivo pessoal.....17
- Fig. 4. Representação esquemática do processo de fertilização em vertebrados. A: ovócito maduro estacionado na metáfase II da meiose sendo fertilizado por um espermatozoide. B: ovócito após a fertilização, o pronúcleo masculino se unirá com o pronúcleo feminino, originando o zigoto. Fonte: adaptada de <http://wp.ufpel.edu.br/zootecnia/files/2011/03/aula-genetica.pdf>.....18
- Fig. 5. Ciclo de vida do *zebrafish* mostrando os principais estágio do desenvolvimento inicial em peixes. Fonte: adaptado de Wolpert *et al.* (2015). .....21
- Fig. 6. Representação esquemática da gametogênese e fertilização em vertebrados, demonstrando a origem da célula germinativa primordial (CGP) e diferenciação destas células até a formação dos gametas em machos (à esquerda) e nas fêmeas (à direita), iniciando um novo ciclo com a fertilização. Fonte: adaptada de <http://irium.com.br/slides/1ano/bio/slides%20em1%20bio%2040.pdf>.....23
- Fig. 7. Procedimentos utilizados na produção de quimeras germinativas, com finalidade de propagação mediada (quimerismo). Fonte: adaptado de Lacerda *et al.* 2013. ....27

### Artigo 1

- Fig. 1. Estereomicrografia de ovócito e ovo de *B. amazonicus*. A: ovócito após extrusão, note a presença da membrana externa, denominada córion (\*) aderida ao ovócito. B: ovo recém-fertilizado após hidratação, observe o amplo espaço perivitelino (↔) e o córion (\*). .....68
- Fig. 2. Visualização dos pronúcleos em ovos de *Brycon amazonicus* corados com DAPI e observados sob microscopia de fluorescência desde a fertilização até 10 mpf. A: Pronúcleos próximos (setas). B: Pronúcleos se fundindo, note que a fusão ocorreu na região central do ovo. C: Pronúcleos fundidos. ....68
- Fig. 3. Frequência de visualização dos pronúcleos em ovos de *Brycon amazonicus* incubados a diferentes temperaturas. \*(mpf = minutos pós-fertilização). (n=20). .....69
- Fig. 4. Desenvolvimento embrionário de *Brycon amazonicus* durante os estágios de clivagem (B-G), blástula (H-O) e gástrula (P-T). A: formação do blastodisco (polo animal- PA) e do polo vegetativo (PV). B: fase de 2 células. C: fase de 4 células. D: fase de 8 células. E: fase de 16 células. F: fase de 32 células. G: fase de 64 células. H: fase de 128 células. I: fase de 256 células. J: fase de 512 células. K: fase de mais de 1000 células. L: fase de alongamento. M: fase esférica. N: fase de cúpula. O: 30% de epibolia. P: 50% de epibolia. Q: Involução celular (setas pontilhadas) e presença de anéis germinativos (setas). R: 80% de epibolia, seta indica escudo embrionário. S: 90% de epibolia, setas indicam movimento de epibolia para fechamento do blastóporo. T: 100% de epibolia, formação do eixo embrionário com

diferenciação da região cefálica (CE) e caudal (CA), cabeça de seta mostra fechamento de blastoporo.....70

Fig. 5. Desenvolvimento embrionário de *Brycon amazonicus* durante o estágio de segmentação até a eclosão. A: embrião com 2 somitos, saco vitelínico (SV) e desenvolvimento da região cefálica (CE) e caudal (CA). B: embrião com 4 somitos, note no tamanho do saco vitelínico (SV). C: embrião com 10 somitos (S) e vesícula óptica (OP). D: embrião com 18 somitos, iniciando desprendimento da cauda (seta fechada) E: embrião com 20 somitos, com vesícula ótica (OT) e vesícula de Kupffer (cabeça de seta). F: embrião com 26 somitos (S), formação da região de extensão do vitelo (seta aberta) e primórdio da notocorda (seta fechada). G: embrião com 30 somitos inicia a formação do sistema nervoso central (SNC) e surge o primórdio da notocorda (seta fechada); note uma visível redução da região de extensão do vitelo (seta aberta) H: embrião com 36 somitos, diferenciação das regiões do sistema nervo central (SNC); prosencéfalo (PRO); mesencéfalo (MES) e rombencéfalo (ROM), note a presença da nadadeira embrionário (cabeça de seta) ao redor da cauda. I: embrião com 38 somitos note a presença da cavidade pericardial (CP). J: larva recém-eclodida com 44 somitos e postura distendida, saco vitelínico (SV) com formato elipsóide e ausência de pigmentação corpórea.....71

Fig. 6. Quantidade progressiva de somitos durante o estágio de segmentação até eclosão em *B. amazonicus* quando incubados em diferentes temperaturas.....72

Fig. 7. Média das dimensões em milímetros (mm) de ovos e embriões de *B. amazonicus* incubados em diferentes temperaturas durante o desenvolvimento embrionário. A: Altura. B: Largura. As medidas de altura e largura estão simbolizadas nas figuras dos ovos abaixo do gráfico. ....73

Fig. 8. Larvas recém-eclodidas de *Brycon amazonicus* destacando as anormalidades morfológicas. A: cabeça (seta fechada) e coração (cabeça de seta) deformado; note que a cauda está mal formada apresentando-se curta. A': coração deformado; note a irregularidade das estruturas cardíacas, seio venoso (seta aberta), átrio (AT) e ventrículo (V). B: cauda curta e saco vitelínico (SV) deformado. C: cavidade pericardial (CP) visivelmente aumentada e consequentemente vitelo deformado; região de extensão do vitelo com extravasamento (em destaque). D: microcefalia (seta) e cauda dobrada. E: cabeça deformada (seta) corpo curvado (linha pontilhada). F: microcefalia (seta) e somitos desuniformes. G: corpo não linear, cauda se desenvolveu voltada para cima (linha pontilhada - indica localização da má formação). ...74

Fig. 9. Desenvolvimento pós-eclosão de *Brycon amazonicus*. A: olho (O) despigmentado, vesícula óptica (OP), formação do sistema nervoso central (SNC) e saco vitelínico (SV) apresentando formato elipsóide e região de extensão do vitelo (em destaque). B: vista dorsal, vesícula ótica (OT) e sistema nervoso central (SNC). C: pigmentação no olho (O) em volta do cálice óptico (CO); cristalino (C), observe o início da formação da boca (cabeça de seta) próximo a região anterior do saco vitelínico (SV). D: notocorda (NO), membrana embrionária (seta), intestino primitivo (em destaque) e abertura anal em formação (\*).E: bulbo olfatório (BO), vesícula ótica (OT), epífise (E) e cavidade pericardial (CP). F: boca (BC), cálice óptico (CO), cristalino (C) e coração em formação, denominado tubo cardíaco (em destaque). G: arcos branquiais (setas abertas), epífise (E), três vesículas primárias que compõem o sistema nervo central (SNC), proencéfalo (PRO) subdividido em telencéfalo (T) e diencéfalo (D); mesencéfalo (MES) e rombencéfalo (ROM) subdividido em metencéfalo (ME) e mielencéfalo (MI). H: vista dorsal da região cefálica, epífise (E); proencéfalo (PRO) composto por bulbo olfatório (BO) e hemisférios cerebrais (HC); mesencéfalo (MES) composto por lóbulo óptico (LO); rombencéfalo (ROM) composto por metencéfalo (originará o cerebelo) e mielencéfalo (originará o bulbo); cordão espinhal (ESP). I: olho (O) com pigmentação mais intensa,

vesícula ótica (OT), saco vitelínico (SV), coração (seta grossa) com distinção do átrio (AT) e ventrículo (V); note o seio venoso (seta fina). J: coração com destaque para seio venoso (seta) e átrio (AT). K: larva normal com 22 hpf em 30°C, boca (BC) aberta, olho (O) com pigmentação, notocorda (NO), membrana embrionária (seta) bem desenvolvida, intestino primitivo (in) bem delimitado e abertura anal (\*). .....75

## Artigo 2

Fig. 1. Características externas de ovos de *Astyanax altiparanae*, durante o estágio de blástula, incubados sob diferentes soluções. Note na morfologia da blastoderme (BL). (a) Controle (água do aquário). (b) Holtfreter. (c) Characin. (d) Ringer. (e) Hanks. (f) D-PBS, observe que os blastômeros desprenderam-se da blastoderme. (g) MEM, a blastoderme apresentou-se irregular. (h) Visão geral dos ovos imersos em solução de MEM. (i) Visão geral dos ovos incubados em solução de Holtfreter. Abreviações: BL, blastoderme; PV, polo vegetativo; seta indica blastômero saliente na blastoderme. Barra de calibração: (a-g) 500 µm; (h, i) 1000 µm. ....101

Fig. 2. Preparação de blastômeros para criopreservação (vitricificação). Os ovos foram injetados com FITC. (a) ovos de *A. altiparanae* no estágio de blástula. (b) e (b') Blastodermes que foram removidas mecanicamente do vitelo, mas ainda apresentam resíduo de vitelo (V). (c) ovo no estágio de blástula para controle e blastodermes sem resíduo de vitelo após serem lavadas em Holtfreter. (d) blastômeros individualizados em placas de Petri. (e) blastômero viável após criopreservação (célula verde). (f) blastômeros mortos evidenciados com iodeto de propidium (células vermelhas). As figuras b', e, f foram fotodocumentadas sob fluorescência. ....102

Fig. 3. Visualização e migração das células germinativas primordiais (CGPs) em embriões e larvas de *A. altiparanae* injetados com GFP-*nos1* 3'UTR mRNA. (a) CGP sob estereomicroscópio. (a') CGP GFP-positivo (célula verde). (b) e (b') embrião em estágio de segmentação, localização das CGPs (seta) na região medial do embrião, entre os somitos (S) e o saco vitelino (SV). (c) e (c') localização das CGPs (seta) em larva com 1 dia após eclosão (dpe). (d) e (d') Larva com 8 dpe. Em (d') note a proliferação das CGPs. (e) e (e'): larvas com 12 dpe, CGPs localizadas dorsalmente ao intestino (IN) e ventralmente a vesícula gasosa (VG). (f) corte histológico longitudinal de larva com 12 dpe com primórdio gonadal (destaque). Coloração de PAS. (g) primórdio gonadal apresentando CGPs (seta) e células somáticas (cabeça de seta). Coloração de PAS. Figuras a', b' c', d' e e' foram mostradas sob fluorescência. Abreviaturas: VG, vesícula gasosa; IN, intestino; P, pronefron; S, somito; SV, saco vitelínico; seta indica célula germinativa primordial (CGP); PAS, ácido periódico de Schiff. ....103

## Artigo 3

Fig. 1. Esquema da localização das CGPs em *B. amazonicus* durante os estágios de desenvolvimento. (a) – embrião em estágio final de segmentação e momento em que as CGPs expressaram inicialmente fluorescência, seta indica região de extensão do vitelo e cabeça de seta aponta as CGPs. (b) – larva com 2 dias pós-eclosão (dpe), com notável redução da região de extensão do vitelo, CGPs migraram caudalmente ao corpo da larva. (c) Larva com 3 dpe, apresentou formação do tubo digestório (TD) e acima deste tubo localizavam-se as CGPs. Abreviações: TD, tubo digestório; V, vitelo. ....117

Fig. 2. Células germinativas primordiais coradas com GFP-*nos1* 3'UTR mRNA em *B. amazonicus* durante os estágios de desenvolvimento inicial. (a) e (a') - estágio final de segmentação e (b) – larva com 2 dpe. (a) Embrião visto sob estereomicroscopia com região de extensão do vitelo bem evidente (seta aberta). (a') Embrião visto sob estereomicroscopia equipada com fluorescência, com CGPs (cabeça de seta) localizadas sobre a região de extensão do vitelo (seta). (b) Larva com 3 dpe, sob fluorescência, com região de extensão do vitelo reduzida (seta) e com o tubo digestório em formação (}), note que as CGPs (cabeça de seta) migraram, ainda no estágio larval, e permaneceram acima do tubo digestório. Abreviações: S, somitos.....117

## Artigo 4

Fig. 1. Ilustração das etapas para a realização do transplante de blastômeros entre duas espécies. A: *B. amazonicus* (espécie doadora), após a fertilização foi realizada a remoção do córion dos ovos através de solução enzimática e posteriormente microinjetados com FITC e durante o estágio de blástula foram retirados blastômeros da região marginal da blastoderme com auxílio de agulha para a realização do transplante. B: *A. altiparanae* (espécie receptora), os ovos foram submetidos a choque de temperatura após 2 min da fertilização (40°C por 2 min) e durante o estágio de blástula receberam blastômeros fluorescentes do embrião doador sendo microinjetados na região mediana da blastoderme. Em somitogênese, os embriões quiméricos de *A. altiparanae* apresentaram células fluorescentes em diversas regiões, as localizações destas células definiam se os embriões eram quimeras germinativas ou somáticas. É importante salientar que uma quimera germinativa pode também apresentar células somáticas quando produzida com este método de transplante. ....131

Fig. 2. Quimera germinativa de *A. altiparanae* (3n) após transplante de blastômeros. (a) e (a'): embrião em estágio de somitogênese apresentando CGPs (seta) na região medial do embrião. (b) e (b'): Larva recém-eclodida, CGPs migraram até as cristas gonadais. Figuras (a) e (b) foram observadas sob estereomicroscopia e (a') e (b') sob estereomicroscopia de fluorescência. ....133

Fig. 3. Embriões quiméricos observados sob estereomicroscopia (a) até (f) e sob fluorescência de (a') até (f'). (a) e (a'): embrião em estágio de blástula logo após o transplante. Note um aglomerado de células fluorescentes (blastômeros) na blastoderme. (b), (b'), (c) e (c'): células fluorescentes do doador migrando no embrião receptor durante estágio de gástrula. (d) e (d'): células embrionárias migrando principalmente para a região cefálica (CE) e caudal (CA) do embrião receptor. (e) e (e'): embrião em estágio de somitogênese, em que os blastômeros exógenos migraram para diversas regiões. (f) e (f'): larva quimérica (somática) recém-eclodida com células fluorescentes integrando o sistema nervoso central. ....134

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Tempo de ocorrência dos eventos morfológicos de <i>B. amazonicus</i> incubados em diferentes temperaturas durante o desenvolvimento embrionário.....  | 65 |
| Tabela 2. Tempo de ocorrência dos eventos morfológicos e de eclosão em <i>B. amazonicus</i> quando incubados em 22°C, 26°C e 30°C. ....                         | 66 |
| Tabela 3. Percentuais de ovos, embriões e larvas de <i>B. amazonicus</i> incubados em 22°C, 26°C e 30°C durante os estágios de desenvolvimento embrionário..... | 67 |

### Artigo 2

|                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Composição das soluções crioprotetoras testadas para vitrificação de blastômeros em <i>A. altiparanae</i> . ....                                                             | 98  |
| Tabela 2. Tempo de remoção do córion em ovos recém-fertilizados de <i>A. altiparanae</i> submetidos a diferentes soluções salinas combinadas com dois tipos de enzima proteolítica. 99 |     |
| Tabela 3. Sobrevivência de embriões de <i>A. altiparanae</i> decorionados submetidos a diferentes soluções salinas, durante os estágios do desenvolvimento embrionário. ....           | 100 |

### Artigo 4

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Percentuais de sobrevivência de embriões quiméricos de <i>A. altiparanae</i> durante os estágios do desenvolvimento embrionário..... | 132 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|



## Resumo Geral

O transplante de células germinativas primordiais (CGPs) é uma abordagem promissora para área da Aquicultura, mas para isso é necessária a compreensão dos estágios de desenvolvimento embrionário e larval como também a padronização de técnicas relacionadas à micromanipulação do embrião e de células germinativas a fim de obter com sucesso quimeras germinativas. Assim, os objetivos desta pesquisa foram avaliar o efeito de três temperaturas (22°C, 26°C e 30°C) sob o desenvolvimento inicial de *B. amazonicus* (espécie doadora); desenvolver protocolos para micromanipulação de ovos, de células embrionárias e de criopreservação de blastômeros em *Astyanax altiparanae* (espécie receptora); identificar as CGPs e a rota de migração dessas células em ambas as espécies, além da produção de quimeras germinativas através do transplante de células embrionárias a fim de que a espécie receptora estéril (3n) produza gametas da espécie doadora. Para isso, os reprodutores das espécies envolvidas foram induzidos hormonalmente à reprodução, os gametas foram extrusados e fertilizados pelo método a seco. Para avaliar o desenvolvimento inicial, ovos recém-fertilizados foram distribuídos em aquários com oxigenação e temperatura controlada, coletados em momentos pré-estabelecidos e analisados sob estereomicroscópio. Para o desenvolvimento do protocolo de micromanipulação de ovos de *Astyanax altiparanae*, inicialmente avaliou-se a eficácia na remoção do córion em alíquotas de ovos recém-fertilizados distribuídas em placas de Petri contendo pronase (0,05%) ou tripsina (0,15%) diluídas em solução salina (Holtfreter; Characin; Ringer; Hanks; D-PBS ou MEM) e foi observada a solução enzimática mais eficiente sem afetar a viabilidade do embrião. Posteriormente, os ovos foram submersos nas mesmas soluções salinas testadas para remoção do córion, livres de enzimas. Para determinar a melhor solução salina de incubação foi observada a morfologia desses ovos. Ovos decorionados de *A. altiparanae* foram microinjetados com isotiocianato de fluoresceína (FITC-coloração verde) durante as primeiras clivagens e na fase de blástula, os blastômeros foram dissociados e imersos em soluções crioprotetoras com diferentes osmolaridade e concentrações para vitrificação. Após o descongelamento, a viabilidade foi analisada com auxílio de iodeto de propídio (cora em vermelho as células mortas). Para visualização e rastreabilidade das CGPs endógenas, ovos decorionados de *A. altiparanae* e *B. amazonicus* foram microinjetados com GFP-*nos1* 3'UTR mRNA no estágio de 1-2 células e mantidos em solução de Holtfreter e Characin, respectivamente e observados em cada estágio do desenvolvimento. Para o transplante, ovos da espécie doadora foram microinjetados com FITC no blastodisco para marcação celular, os ovos da espécie receptora foram submetidos a choque térmico para triploidização (3n). Quando as duas espécies atingiram o estágio de blástula, os blastômeros corados (doador) foram transplantados na blastoderme de embriões receptores não corados. A taxa de peixes quiméricos e a migração dos blastômeros do doador no embrião receptor foram mensuradas. Os resultados mostraram que a duração dos estágios de desenvolvimento foi maior em 22°C e menor em 30°C, e a fase de 512-1000 blastômeros, no estágio de blástula, fase de interesse para o transplante celular, foi de 1 h 30 min a 22°C e limitada a 25 min nas demais temperaturas, afetando também o tempo de eclosão. A solução mais eficiente para remoção do córion em *A. altiparanae* foi de Characin com pronase (1:44 min) e para incubação dos ovos foi a solução de Holtfreter por apresentar blastômeros com tamanhos semelhantes, formando uma massa uniforme similar aos do controle. Após a criopreservação, 10% de blastômeros viáveis foram obtidos em quatro soluções crioprotetoras (DMSO, EG e sacarose) com osmolaridade de 1,5; 4,5; 6,5 e 7,5. As CGPs



GFP-positivas foram visualizadas em ambas as espécies no estágio de somitogênese, localizadas na região medial do embrião, as quais migraram durante o desenvolvimento inicial. Com o transplante de blastômeros obteve-se uma quimera germinativa, a qual apresentou células fluorescentes na região das cristas gonadais, sendo observadas, inicialmente em estágio de final segmentação. Estes resultados proporcionam conhecimentos para a manipulação de embriões sob diferentes temperaturas, o que permite acelerar ou retardar estágios específicos do desenvolvimento embrionário otimizando o tempo de micromanipulação de embriões para aplicações em estudos biotecnológicos; fornece informações sobre as condições necessárias para o preparo e a manutenção de embriões e blastômeros para o transplante de células embrionárias e ainda, proporciona conhecimento sobre a morfologia e a rota de migração de CGPs endógenas de *A. altiparanae* e *B. amazonicus* e que possibilitou a produção de quimeras interespecíficas.

**Palavras-chave:** desenvolvimento, transplante, embrião, rota migratória, quimera.

## General Abstract

Primordial germ cell (PGCs) transplantation is a promising approach for aquaculture area, but it is necessary the understanding of the embryonic and larval development stages as well as the standardization of techniques related to embryo micromanipulation and germ cells in order to get germ chimeras successfully. Thus, the aims of this research were to evaluate the effect of three temperatures (22°C, 26°C and 30°C) on the early development of *Brycon amazonicus* (donor species); develop protocols for micromanipulation of egg, embryonic cells and blastomeres cryopreservation in *Astyanax altiparanae* (host species); identify the PGCs and their migration route in both species, also producing germ chimeras through transplantation of embryonic cells to host sterile species (3n) in order to produce gametes from the donor species. For this, broodstock of the involved species were hormonally induced to reproduction, and the gametes were stripped and fertilized by dry method. To evaluate the early development, newly fertilized eggs were distributed into aquarium with controlled oxygenation and temperature, collected at pre-established times and analyzed under a stereomicroscope. For the development of micromanipulation protocol of eggs from *Astyanax altiparanae*, it was initially evaluated the effectiveness of removing the chorion, in aliquots of newly fertilized eggs distributed on Petri dishes containing pronase (0.05%) or trypsin (0.15%) diluted in saline solutions (Holtfreter; Characin; Ringer; Hanks, D-PBS or MEM) and it was observed the most efficient enzymatic solution without affecting the viability of the embryo. After dechoriation, the eggs were submerged the same saline solutions tested for removing the chorion, free of enzymes. To determine the best incubation saline solution, morphology and quantification of the eggs were performed. Dechorionated eggs of *A. altiparanae* were microinjected with fluorescein isothiocyanate (FITC, green color) during the first cleavages and in blastula stage the blastomeres were dissociated and immersed in cryoprotectant solutions with different concentrations and osmolarity for vitrification. After thawing, the viability was analyzed by using propidium iodide (staining in red dead cells). For viewing and tracing of endogenous of PGCs, dechorionated eggs of *A. altiparanae* and *B. amazonicus* were microinjected with GFP-*nos1* 3'UTR mRNA in stage of 1-2 cells and kept in Holtfreter's and Characin solutions, respectively, and observed at each development stage. For transplant, donor specie eggs were microinjetados with FITC in blastodisc for cell labeling, the eggs of the host species were heat shocked for triploidization (3n). When the two species reached the blastula stage, the stained blastomeres (donor) were transplanted in blastoderm of unstained host embryos. The rate of chimeric fish and the migration of the donor blastomeres the recipient embryo were measured. The results showed that the duration of the stages of development was higher at 22°C and lower at 30°C, and the phase of 512-1000 blastomeres, the blastula stage, phase of interest to the cell transplant was 1 h 30 min at 22°C and 25 min in the other temperatures, affecting also the time of hatching. The most efficient solution for removing the chorion in *A. altiparanae* was Characin solution with pronase (1:44 min) and for eggs incubation was Holtfreter's solution because of the presentation of blastomeres with similar sizes forming a uniform mass as the control. After cryopreservation, 10% of viable blastomeres were obtained in four cryoprotectant solutions (DMSO, EG and sucrose) with osmolarity of 1.5; 4.5; 6.5 and 7.5. The GFP-positive PGCs were observed in both species in the somitogenesis stage, located in the medial region of the embryo, which were migrated during the early development. With the blastomeres transplantation, it was obtained a germline chimera, showing fluorescent cells



in region of gonadal ridges, being observed initially in end-stage segmentation. These results provide knowledge to manipulate embryos under different temperatures allowing to accelerate or retard specific stages of embryonic development, optimizing the time of embryo micromanipulation for applications in biotechnological studies; provide information about the conditions required for preparing and maintaining embryos and blastomeres for transplantation of embryonic cells and provide knowledge about the morphology and migration route of the endogenous PGCs of *A. altiparanae* and *B. amazonicus*, which allowed the production of interspecific chimeras.

**Keywords:** development, transplant, embryo, migratory route, chimera.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de peixes mundial aumentou consideravelmente nas últimas décadas, atingindo uma produção de aproximadamente 142 milhões de toneladas em 2008. A produção de pesca de captura se estabilizou em 88-94 milhões de toneladas ao longo da última década, enquanto na aquicultura tem aumentado significativamente e contribui agora com 37% da produção total de peixe e 46% do total destinados ao consumo humano (OECD-FAO, 2015).

No Brasil isso não foi diferente, a produção nacional de pescado foi de 1.241.807 toneladas em 2013, obtendo a maior participação da pesca, com 765.288 toneladas do total produzido, demonstrando a predominância da pesca em relação à aquicultura (Oliveira, 2015). Este cenário mostra que a situação atual é de sobre-exploração dos estoques pesqueiros, tanto continentais quanto marinhos (MPA, 2015). Mesmo assim, a produção da aquicultura tem sido significativa, com uma taxa média de crescimento de cerca de 9% ao ano na última década, sendo que os principais aumentos estão relacionados às espécies de água doce. As perspectivas para aquicultura brasileira são boas, com um crescimento esperado na produção acima de 52% de 2012 até 2024, impulsionado pelo aumento da demanda interna (OECD-FAO, 2015).

Contudo, a piscicultura ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento devido aos processos de produção adotados e a falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico (Beerli *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2008). Isso sugere a aplicação de tecnologias que conservem as espécies Neotropicais e incrementem a produção de pescado através da aquicultura, como é o caso do quimerismo, que se resume no transplante de células embrionárias de um indivíduo (doador) para outro (receptor), no qual as células transplantadas podem originar células da linhagem germinativa e obter prole do doador (Nilsson e Cloud, 1992; Chen *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2004).

Os peixes semelhantemente aos organismos que se reproduzem sexualmente apresentam duas linhagens celulares: as células somáticas fundamentais, as quais formam o corpo do organismo e as células germinativas, que são responsáveis pela transferência do genoma para a seguinte geração (Cinalli *et al.*, 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário, os peixes apresentam células precursoras das células germinativas que são conhecidas como células germinativas primordiais

(CGPs), e que se diferenciam em espermatozoide nos machos ou ovócito nas fêmeas após diferenciação gonadal (Yoshizaki *et al.*, 2003; Yamaha *et al.*, 2007). As CGPs são distinguíveis das células somáticas, durante o desenvolvimento embrionário, por apresentarem herança materna citoplasmática denominada de germoplasma ou plasma germinativo (Shinomiya *et al.*, 2000). Essas células germinativas, originárias de uma região particular do embrião, muitas vezes surgem a uma distância relativamente grande de onde irão permanecer definitivamente, tendo que realizar, portanto a migração para o futuro local das gônadas, conhecido como cristas gonadais, e posteriormente, estas células irão se diferenciar em células germinativas maduras (Raz e Hopkins, 2002; Molyneaux e Wylie, 2004).

Com o transplante dessas células embrionárias se objetiva apenas a produção de gametas exógenos, mas para que isso seja possível, deve-se empregar embriões receptores estéreis, como é o caso de alguns híbridos (Yamaha *et al.*, 2003) ou triplóides (Felip *et al.*, 2009; Feindel *et al.*, 2011; Hamasaki *et al.*, 2013).

No entanto, para a obtenção de quimeras germinativas em peixes, diferentes metodologias tem sido desenvolvidas utilizando receptores em diferentes fases do desenvolvimento, tais como, embriões em estágio de blástula, larvas recém-eclodidas e peixes sexualmente maduros (Lacerda *et al.*, 2013). As técnicas mais utilizadas são o de transplante de blastômeros (Takeuchi *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2008); de uma porção da blastoderme (Kazama-Wakabayashi *et al.*, 1999); de células espermatogoniais (Okutsu *et al.*, 2006) e de células germinativas primordiais (CGPs) (Takeuchi *et al.*, 2003; Yamaha *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2008). Dessa forma, células germinativas de peixes de difícil manejo reprodutivo ou de espécies que estão ameaçadas de extinção podem ser transplantadas para embriões de espécies com protocolo de reprodução bem estabelecido (Nakagawa *et al.*, 2002).

Para aplicar a técnica de transplante celular durante a fase embrionária ou larval é fundamental compreender o desenvolvimento inicial das espécies envolvidas, com descrição detalhada para facilitar à manipulação dos embriões (Fujimoto *et al.*, 2006) inclusive sob diferentes temperaturas (Nakauth *et al.*, 2015), buscando otimizar o tempo de micromanipulação em embriões e larvas e também conhecer a melhor condição para mantê-los sem afetar seu desenvolvimento normal.

Neste estudo foi utilizada como espécie doadora o matrinxã (*Brycon amazonicus*), espécie de grande porte e desova anual e, como receptora o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), que apresenta pequeno porte e desova intermitente. Estas espécies foram selecionadas devido aos aspectos reprodutivos e sua relevância econômica e ecológica.

Quando se trata de transplante celular entre duas espécies distintas, a utilização da técnica de criopreservação pode facilitar a manipulação das CGPs, podendo auxiliar na produção de quimeras germinativas através de CGPs criopreservadas. Essa forma de preservação *in vitro* também pode dar suporte à programas de melhoramento genético auxiliando a conservação *ex situ* através da preservação dos genomas de espécies ameaçadas (banco de germoplasma) (Tsai e Lin, 2012).

Para a confirmação do quimerismo ou a visualização das CGPs pode-se empregar marcadores fluorescentes ligados ao gene específico dessas células, possibilitando a identificação e rastreabilidade *in vivo*. Isso é possível usando mRNA sintetizado a partir de um gene responsável pela tradução da proteína fluorescente verde (GFP), a qual é fundida com a região não traduzida 3' do gene específico encontrado apenas nas CGPs, como *vasa*, *nanos* (*nos-1* ou *nos-2*) (Köprunner *et al.*, 2001; Otani *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2012; Presslauer *et al.*, 2012); e *olvas* (Tanaka *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2007). Outra forma de confirmação é através da utilização de técnicas histológicas, que segundo Yamaha *et al.* (2010), as CGPs se diferenciam das células somáticas por se apresentarem redondas, relativamente grandes com um núcleo ocupando a maior parte volume citoplasmático e membrana nuclear clara.

A aplicação do quimerismo em peixes é promissora, podendo ser usada para aumentar o tamanho de uma dada população, preservar ou recuperar espécies ameaçadas de extinção (Yamaha *et al.*, 2003), reduzir a sazonalidade da oferta de alevinos, e ainda, através de CGPs criopreservadas pode-se alavancar tecnologias de preservação do patrimônio ictiogenético (bancos genéticos) (Saito *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2010) que futuramente poderão ser empregadas em outras espécies onde a propagação é considerada crítica.

Para elucidar os resultados, a tese foi dividida em quatro artigos, os quais foram desenvolvidos de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em



Experimentação Animal da UNESP, campus de Jaboticabal-SP, sob número 018413/13 (Anexo 1), que seguem:

Artigo I: “Manipulação da temperatura sob o desenvolvimento inicial de *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 como ferramenta para a biotecnologia”.

Artigo II: “Protocolo de micromanipulação, criopreservação e observação de células germinativas primordiais (CGPs) em *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000”.

Artigo III: “Rastreabilidade de células germinativas primordiais (CGPs) *in vivo* usando GFP-*nos1* 3’UTR mRNA em *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829”.

Artigo IV: “Produção de quimera germinativa utilizando *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 como modelo biológico: uma alternativa para preservação de espécies ameaçadas de extinção”.

## 2. OBJETIVO GERAL

Produzir quimeras germinativas através de transplante de células embrionárias entre duas espécies de peixes nativas do Brasil, para que a espécie receptora (*Astyanax altiparanae*) produza gametas da espécie doadora (*Brycon amazonicus*).

### 2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito de três temperaturas controladas (22°C, 26°C e 30°C) sob o desenvolvimento inicial de *B. amazonicus*.

Identificar as células germinativas primordiais (CGPs) e a rota de migração dessas células na espécie doadora (*B. amazonicus*) e receptora (*A. altiparanae*).

Estabelecer condições apropriadas (protocolo) para micromanipulação de embriões e de células embrionárias de *B. amazonicus* e *A. altiparanae*.

## 3. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa que abrange o Laboratório de Biotecnologia, localizado no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental CEPTA/ICMBio, no município de Pirassununga-SP, Brasil e do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, campus da UNESP de

mesma fase pode diferenciar não só em células somáticas, mas também nas células germinativas (Ho e Kimmel, 1993). Corroborando ao relatado por estes autores, neste estudo foi obtida quimera germinativa com o transplante de blastômeros.

Neste estudo, a espécie *A. altiparanae* proporcionou ovos de fácil manejo e resistentes a micromanipulação, sendo sugerida para a utilização como modelo biológico experimental. Levando em conta que esta espécie apresentou todos os requisitos básicos que Bolis *et al.* (2001) declararam ser necessários para uma espécie modelo, tais como, possuir ciclo de vida curta, produzir ovos em grandes quantidades, proporcionar gametas e ovos facilmente manipuláveis e que o desenvolvimento embrionário possa ser acompanhado. A quantidade de quimeras somáticas obtidas neste estudo foi superior em relação às quimeras germinativas, sendo necessário avaliar o efeito dos blastômeros transplantados de *B. amazonicus* para *A. altiparanae*. Pois, Nakagawa e Ueno, (2003) mostraram que os *loach* quiméricos somáticos apresentaram pigmentação semelhante ao do doador quando adultos.

## 5. CONCLUSÕES

Com a utilização do FITC foi possível identificar e rastrear as células transplantadas no embrião receptor. No entanto, a metodologia de transplante de blastômeros corados com este corante fluorescente durante o estágio de blástula não foi eficiente para produzir em larga escala quimeras germinativas, gerando em sua maioria, quimeras somáticas.

A aplicação da biotecnologia com a produção de quimeras germinativas na aquicultura pode ser uma alternativa para conservação de espécies ameaçadas de extinção. E embriões de *A. altiparanae* são resistentes à micromanipulação podendo ser empregados como receptor de células embrionárias para tal finalidade.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa proporciona a compressão de mecanismos básicos para a realização do transplante durante o estágio de blástula e direciona a pesquisa biotecnológica para atingir o objetivo de produzir em massa quimeras germinativas. Contudo, a autora propõe a utilização de marcadores moleculares fluorescentes com a finalidade de marcar especificamente as células germinativas primordiais (CGPs) para que sejam somente

transplantadas estas células em embriões receptores estéreis, a fim de alcançar taxas mais elevadas de quimera germinativa.

Outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) foi possível visualizar e rastrear as CGPs em *A. altiparanae* utilizando GFP-*nos1* 3'UTR mRNA, podendo ser este corante fluorescente empregado para tal finalidade em *B. amazonicus*. Possibilitando também, aplicar a técnica de criopreservação das CGPs.

## 7. AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA/ICMBio), Pirassununga-SP e ao Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP pelo fornecimento dos animais e espaço físico. Ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) (Processo num. 140633/2013-8) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo num. 2010/17429-1) pelo suporte financeiro.



## 8. REFERÊNCIAS

- Adamov, N. S. M.; Nascimento, N. F.; 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. Triploid induction in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* using temperature shock **Aquaculture Research**, 2016.
- Barbieri, G.; Afonso-Marins, M. Estudo da dinâmica da reprodução de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) da represa do Lobo, Estado de São Paulo (Osteichthyes, Characidae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1191-1197, 1995.
- Bolis, C.; Piccolella, M.; Dalla Valle, A.; Rankin, J. C. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological research**, v. 44, n. 4, p. 265-280, 2001. ISSN 1043-6618.
- CEMIG/CETEC. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: 2000. 144 ISBN 85-87929-03-8.
- Feindel, N.; Benfey, T.; Trippel, E. Gonadal development of triploid Atlantic cod *Gadus morhua*. **Journal of Fish Biology**, v. 78, n. 7, p. 1900-1912, 2011. ISSN 1095-8649.
- Felip, A.; Carrillo, M.; Zanuy, S. Older triploid fish retain impaired reproductive endocrinology in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 10, p. 2657-2669, Dec 2009. ISSN 0022-1112. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273899600015 >.
- Fujimoto, T.; Kataoka, T.; Otani, S.; Saito, T.; Aita, T.; Yamaha, E.; Arai, K. Embryonic stages from cleavage to gastrula in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. **Zoological Science**, v. 21, n. 7, p. 747-755, 2004.
- Fujimoto, T.; Kataoka, T.; Sakao, S.; Saito, T.; Yamaha, E.; Arai, K. Developmental Stages and Germ Cell Lineage of the Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Zoological Science**, v. 23, p. 977-989, 2006.
- Garutti, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: UNESP, 2003. p. 330 ISBN 85.7139.470.9.
- Gomes, L. C.; Urbinati, E. C. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: UFSM (Ed.). **Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil**. Santa Maria, 2005. p.149-164.
- Hamasaki, M.; Takeuchi, Y.; Miyaki, K.; Yoshizaki, G. Gonadal Development and Fertility of Triploid Grass Puffer Takifugu niphobles Induced by Cold Shock Treatment. **Marine Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 133-144, Apr 2013. ISSN 1436-2228. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314987500002 >.
- Hayashi, C.; Meurer, F.; Boscolo, W. R.; Lacerda, C. H. F.; Kavata, L. C. B. Frequência de Arraçoamento para Alevinos de Lambari do Rabo-Amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 21-26, 2004.



Kawakami, Y.; Goto-Kazeto, R.; Saito, T.; Fujimoto, T.; Higaki, S.; Takahashi, Y.; Arai, K.; Yamaha, E. Generation of germ-line chimera zebrafish using primordial germ cells isolated from cultured blastomeres and cryopreserved embryoids. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 10, p. 1493, 2010. ISSN 0214-6282.

Lacerda, S. M. S. N.; Costa, G. M. J.; Campos-Junior, P. H. A.; Segatelli, T. M.; Yazawa, R.; Takeuchi, Y.; Morita, T.; Yoshizaki, G.; França, L. R. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 3-11, 2013.

Lima, F. C. T.; Castro, R. M. C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 11, n. 2, p. 155-162, 2000. ISSN 0936-9902.

Lobon-Cervia, J.; Bennemann, S. Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in Rio Tibagi (Paraná, Southern Brazil). **Archiv für Hydrobiologie**, v. 149, n. 2, p. 285-306, 2000. ISSN 0003-9136.

Lutz, C. G. **Practical Genetics for Aquaculture**. London: Blackwell, 2003.

MMA. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Ambiente, M.D.M., 2008. p. 1420.

Nakagawa, M.; Kobayashi, T.; Ueno, K. Production of Germline Chimera in Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and Proposal of New Method for Preservation of Endangered Fish Species. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 624-631, 2002.

Nakagawa, M.; Ueno, K. Production of chimeric loach by cell transplantation from genetically pigmented to orange embryos. **Zoological Science**, v. 20, n. 3, p. 333-338, 2003. ISSN 0289-0003.

Porto-Foresti, F.; Castilho-Almedia, R. B.; Foresti, F. Biologia e criação do lambari-dorabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTO, B. e GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p.105-120.

Saito, T.; Gto-Kazeto, R.; Arai, K.; Yamaha, E. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 159-166, 2008.

Silveira, G. L.; Silva, C. E.; Irion, C. A. O.; Cruz, J. C.; Retz, E. F. Balanço de Cargas Poluidoras pelo Monitoramento Quali-quantitativo dos Recursos Hídricos em Pequena Bacia Hidrográfica. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 8, n. 1, p. 5-11, 2003.

Woynarovich, E.; Horváth, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 1983.



Yamaha, E.; Murakami, M.; Hada, K.; Otani, S.; Fujimoto, T.; Tanaka, M.; Sakao, S.; Kimura, S.; Sato, S.; Arai, K. Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft. **Genetica**, v. 119, p. 121-131, 2003.

Yasui, G. S.; Fujimoto, T.; Sakao, S.; Yamaha, E.; Arai, K. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 8, p. 2380-2388, 2011. ISSN 1525-3163.

Yoshizaki, G.; Takeuchi, Y.; Kobayashi, T.; Takeuchi, T. Primordial germ cell: a novel tool for fish bioengineering. **Fish Fisiology and Biochemistry**, v. 28, p. 453-457, 2003.