

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 01/10/2023.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**Caracterização e transplante de células germinativas  
primordiais em peixes neotropicais**

**Geovanna Carla Zacheo Coelho**

**Botucatu  
2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**CÂMPUS DE BOTUCATU**

**Caracterização e transplante de células germinativas  
primordiais em peixes neotropicais.**

**Geovanna Carla Zacheo Coelho**

**Orientador:**

Dr. George Shigueki Yasui

**Coorientadores:**

Dr. Paulo Sergio Monzani

Dr. Juliano Rodrigues Sangalli

Tese apresentada ao Instituto de Bociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Botucatu, SP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas – Área de concentração: Zoologia.

**Botucatu**  
**2021**

C672c Coelho, Geovanna Carla Zacheo  
Caracterização e transplante de células germinativas primordiais em peixes neotropicais / Geovanna Carla Zacheo Coelho. -- Botucatu, 2021  
133 p. : il., tabs., fotos  
  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: George Shigueki Yasui  
Coorientador: Paulo Sergio Monzani  
  
1. Biotecnologia. 2. Reprodução. 3. Transplante. 4. Células germinativas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Dr. George Shigueki Yasui pela oportunidade de desenvolver o projeto no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, orientação e recursos. Agradeço também o Dr. Paulo Sergio Monzani e Dr. José Augusto Senhorini, pela oportunidade, paciência, por estarem sempre dispostos a nos ouvir e pela confiança. Juntamente agradeço o Dr. Juliano Rodrigues Sangalli pela coorientação.

Agradeço aos meus antigos orientadores Prof<sup>a</sup> Dr. Eliana Gimenes, Prof<sup>a</sup> Dr. Andreia Moreira, Prof<sup>o</sup> Dr. Alexandre Ninhaus e Prof<sup>a</sup> Dr. Rosicleire Verissimo. Sou eternamente grata pelos ensinamentos, confiança, amizade e conselhos.

Agradeço a todos que estiveram no Laboratório de Biotecnologia de Peixes desde o início do doutorado, Bruna, Talita, Lauriene, Barbara, Jenyffer, Giseli, Hatus, Gabriel, Gustavo, Andreolli, Nathalia, Rafaela, Dilberto, Natalia, Amanda, Raphael, Nycolas, Nivaldo e Reizão. Deixo um agradecimento carinhoso aos moradores do alojamento e casinha, vivemos bons momentos.

Em especial agradeço a três pessoas que foram importantes durante essa trajetória. Lucia Suarez Lopez, pela amizade, companheirismo, por sempre estar disposta a ouvir e compartilhar ideias e principalmente por ter me ajudado a passar por diversos momentos difíceis. Jhennifer Gomes, que desde o segundo dia (no primeiro eu fui chata) foi uma grande parceira, compartilhando inúmeros momentos bons e ruins, obrigada por dividir um pouco da sua vida e por sempre me ver como uma boa pessoa. Gabriella Carvalho, por me ensinar a ser mais paciente, por dividir e tornar mais suave as tensões das coletas de dados no período reprodutivo.

A Cristiane, Patrícia e Renan que apesar de alguns anos distantes fisicamente, sempre estiveram presentes. Estão sempre dispostos a tirar um tempo para conversar, aconselhar e dividir momentos da vida.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (ICMBio/CEPTA), pela utilização das instalações e fornecimento de peixes. Agradeço a todos os funcionários e colaboradores do CEPTA, pela ajuda, ensinamentos, paciência, amizade e diversas histórias compartilhadas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo consentimento da bolsa de doutorado. A AES Tiete e CTG Brasil pelo apoio financeiro para execução de projetos no laboratório.

Aos membros da banca de qualificação e defesa Prof<sup>a</sup> Dra. Samyra Nassif Lacerda, Prof<sup>a</sup> Dra. Fabiana Bressan, Prof<sup>a</sup> Dra. Renata Guimarães, Prof<sup>o</sup> Dr. Ricardo Pereira que gentilmente aceitaram o convite para fazer parte desta etapa final do doutorado, contribuindo com seus conhecimentos.

Agradeço de forma carinhosa ao Lucas Takafuji por compartilhar nossas vidas, por incentivar a seguir meus sonhos e a ser uma pessoa melhor, obrigada por me ouvir e estar sempre ao meu lado. Agradeço também a família Takafuji por terem me acolhido.

A Marisa, Messias e Giuseppe, minha família. Sou eternamente grata por ter vocês. Obrigada por tudo que representam, por serem a minha base e saber que posso contar sempre com vocês, por aceitarem minhas escolhas e estarem ao meu lado em todos os momentos. Eu amo vocês!

Por fim, a Deus, por estar presente nos pequenos detalhes da vida, no qual apenas quem acredita é capaz de enxergar.

## RESUMO

Atividades antrópicas aumentam o número de espécies de peixes ameaçadas, e, portanto, esforços na conservação são necessários para atenuar tais efeitos. O estabelecimento de bancos genéticos e procedimentos de reconstituição são então essenciais para a manutenção da ictiofauna, incluindo o transplante de células germinativas primordiais (PGCs), para posterior reconstituição de espécies ameaçadas de extinção, por meio da geração de quimeras germinativas e propagação substituta. Apesar do potencial mencionado acima, a produção de quimeras germinativas em espécies de peixes nativas ainda não foi estabelecida. O objetivo deste trabalho foi produzir quimeras germinativas em espécies nativas por meio do transplante de PGCs em receptores estéreis em fase de blástula. A marcação e rastreabilidade da rota de migração de PGCs *in vivo* em *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus* foi realizada com sucesso, utilizando microinjeção de mRNA sintetizado *in vitro*, constituído pela sequência codificante do gene repórter GFP fusionada com a região reguladora de tradução 3' UTR do gene *nanos1* de *Danio rerio*. As PGCs de *A. altiparanae* e *P. lineatus* cultivadas em solução salina ou meio suplementado foi obtida e transplantada em receptores triploides de (*A. altiparanae*) e/ou híbridos triploides (*A. altiparanae* X *A. fasciatus*). As PGCs de *A. altiparanae* cultivadas em meio suplementado tiveram migração direcionada para a região da crista gonadal em 4,5% dos receptores triplóides e em 19,3% dos híbridos triplóides, enquanto as PGCs cultivadas em solução salina apresentaram apenas migração ectópica. No transplante de PGCs de *P. lineatus*, apenas migração ectópica foi observada nos receptores híbridos triploides. A análise do nível de expressão de genes específicos de PGCs foi realizada em diferentes tecidos, além da comparação da expressão entre PGCs isoladas em diferentes meios de cultura. Os resultados indicaram que a maior parte da expressão gênica é detectada apenas em gônadas adultas. A expressão gênica em PGCs isoladas demonstra maior nível de expressão em *dnd1*, *ddx4* e *dazl* em PGCs cultivadas em meio de cultura suplementado em comparação com PGCs de solução salina, indicando que o meio de cultura ajuda a manter as características dessas células. As expressões de *nanos* e *cxcr4b* foram diminuídas em PGCs do meio de cultura suplementado em relação à solução salina. Esses genes são marcadores de PGCs e estão diretamente ligados a diferenciação e migração dessas células, alterações nos níveis de expressão podem levar a perda da identidade celular e migração ectópica. O presente estudo traz novas abordagens sobre o transplante de células germinativas primordiais em espécies nativas de peixes, incluindo procedimentos de micromanipulação e transplante de PGCs em espécies da região neotropical. Essas informações são importantes para a construção de bancos genéticos e a reconstituição de espécies ameaçadas.

**Palavras-chave:** Biotecnologia. Reprodução. Transplante. Células Germinativas.

## ABSTRACT

Anthropogenic activities increase the number of threatened fish species and, therefore, conservation efforts are necessary to attenuate such effects. The establishment of gene banks and reconstitution procedures are then essential for the maintenance of the ichthyofauna, including the transplantation of primordial germ cells (PGCs), for subsequent reconstitution of endangered species, through the generation of germline chimera and surrogate propagation. Despite the potential mentioned above, the production of germline chimeras in native fish species has not yet been established. The objective of this work was to produce germline chimera within native species, by the transplantation of PGCs into sterile hosts at the blastula stage. The labelling and traceability of the migration route of PGCs *in vivo* in *Prochilodus lineatus* and *Piaractus mesopotamicus* was successfully performed, using microinjection of mRNA synthesized *in vitro*, constituted by coding sequence of the *gfp* reporter gene fused with the 3' UTR translation regulatory region of the gene *nanos1* from *Danio rerio*. The fluorescence labeling of PGCs was specific for the germline of both species studied. The PGC from *A. altiparanae* and *P. lineatus* cultured into saline solution or supplemented medium was achieved and transplanted into triploid hosts of (*A. altiparanae*) and/or triploid hybrids (*A. altiparanae* X *A. fasciatus*). PGCs of *A. altiparanae* cultured in supplemented medium, had directed migration to the gonadal ridge region was in 4.5% of triploid hosts and in 19.3% of triploid hybrid hosts, while PGCs cultured in saline solution showed only ectopic migration. In the transplantation of PGCs from *P. lineatus*, only ectopic migration was observed in the triploid hybrid hosts. The level expression analysis of specific genes of PGCs was performed in different tissues, in addition to the comparison of expression between PGCs isolated in different culture media. The results indicated that most gene expression is detected only in adult gonads. Gene expression in isolated PGCs demonstrates greater expression of *dnd1*, *ddx4* and *dazl* in PGCs grown in supplemented culture medium compared to PGCs from saline solution, indicating that the culture medium helps to maintain the characteristics of PGCs. *Nanos* and *cxcr4b* expressions were decreased in PGCs from supplemented culture medium in relation to saline solution. These genes are markers of PGCs and are directly linked to differentiation and migration of these cells, changes in expression levels can lead to loss of cell identity and ectopic migration. The present study brings new insights regarding the transplantation of primordial germ cells in native fish species, including micromanipulation procedures and PGCs transplantation in species from the neotropical region. Such information is important for genebanking and reconstitution of threatened species.

**Keywords:** Biotechnology. Reproduction. Transplant. Germ Cells.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela 1:** Porcentagem de sobrevivência de embriões e de larvas normais e anormais de *Prochilodus lineatus* durante o desenvolvimento embrionário, nos diferentes grupos experimentais. .... 52

**Tabela 2:** Porcentagem de sobrevivência de embriões e de larvas normais e anormais de *Piaractus mesopotamicus* durante o desenvolvimento embrionário, nos diferentes grupos experimentais..... 52

### Capítulo II

**Tabela 1:** Estratégias de transplantes de PGCs utilizando diferentes doadores e receptores, diferentes meios e número de repetições..... 69

**Tabela 2:** Transplante de células germinativas primordiais alogênico e xenogênico obtidas pelo cultivo de células em diferentes condições, em embriões receptores triploides e híbridos triploides..... 71

**Tabela 3:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles (doador e receptor) e dos receptores triploides transplantados GFP positivos, utilizando PGCs de *A. altiparanae*, oriundas do cultivo em solução salina..... 74

**Tabela 4:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles (doador e receptor) e dos receptores híbridos triploides transplantados GFP positivos, utilizando PGCs de *A. altiparanae*, oriundas do cultivo em solução salina. .... 74

**Tabela 5:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles (doador e receptor) e dos receptores triploides transplantados GFP positivos, utilizando PGCs de *A. altiparanae*, oriundas do meio de cultivo suplementado. .... 75

**Tabela 6:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles (doador e receptor) e dos receptores híbridos triploides transplantados GFP positivos, utilizando PGCs de *A. altiparanae*, oriundas do meio de cultivo suplementado. .... 75

**Tabela 7:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles e de transplantados em receptores híbridos triploides com PGCs GFP positivas de *P. lineatus* cultivadas em meio salino. .... 82

**Tabela 8:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles e de transplantados em receptores híbridos triploides com PGCs GFP positivas de *P. lineatus* cultivadas em meio suplementado. .... 82

### Capítulo III

**Tabela 1:** Primers utilizados para avaliar a expressão gênica de células germinativas primordiais em *Astyanax altiparanae*. .... 99

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

**Figura 1:** Principais metodologias de transplante de células germinativas primordiais (PGCs), espermatogônias (SPG) e oogônias (OOG) para receptores em fase de blástula, larva e adultos relatadas em peixes..... 16

### Capítulo I

**Figura 1:** Visualização in vivo de células germinativas primordiais (PGCs) em estágio de segmentação em embriões injetados com mRNA (GFP-*nanos1* 3'UTR). **A** e **B** - Embrião de *Prochilodus lineatus* com 11 somitos (PGCs, ponta da seta). **C** e **D** - Embrião de *Piaractus mesopotamicus* com 10 somitos (PGCs, ponta da seta). **E** e **F** - Detalhe da região destacada em **C** e **D** (PGCs, ponta da seta). **B**, **D** e **F** são imagens capturadas sob fluorescência de **A**, **C** e **E** ..... 53

**Figura 2:** Visualização in vivo de células germinativas primordiais (PGCs) em larvas de *Prochilodus lineatus* injetadas com mRNA de GFP-*nanos1* 3'UTR. **A** e **B** - Larva recém-eclodida (PGCs, ponta de seta). **C** - Detalhe da região destacada em **B**. **D** e **E** - Larva 10 dias após a eclosão (PGCs, ponta de seta). **F** - Detalhe da região destacada em **E**. **B** e **E** são imagens capturadas sob fluorescência de **A** e **D**, respectivamente. .... 55

**Figura 3:** Visualização in vivo de células germinativas primordiais (PGCs) em larvas de *Piaractus mesopotamicus* injetados com mRNA de GFP-*nanos1* 3'UTR. **A** e **B** - Larva recém-eclodida (PGCs, ponta de seta). **D** e **C** - Larva com 4 dias após a eclosão (PGCs, ponta de seta). **E** e **G** - Larvas com 7 dias após a eclosão (PGCs, ponta de seta). **G** - Detalhe da região destacada em **F**. **B**, **D** e **F** são imagens capturadas sob fluorescência de **A**, **C** e **E** respectivamente. .... 55

**Figura 4:** Número médio de células germinativas primordiais (PGCs) positivas para GFP. **A** - PGCs evidenciadas em *Prochilodus lineatus* durante o estágio de segmentação até o 10° dia após a eclosão. **B** - PGCs evidenciadas em *Piaractus mesopotamicus* durante o estágio de segmentação até o 9° dia após a eclosão. Embriões e larvas foram incubados a 26°C. .... 56

### Capítulo II

**Figura 1:** Procedimentos experimentais do transplante de PGCs. Transplante de PGC GFP positiva de *Prochilodus lineatus* ou *Astyanax altiparanae* para embrião em estágio de blástula de *Astyanax* híbrido triploide. **1** - Desova e fertilização de gametas de *Prochilodus lineatus* ou *Astyanax altiparanae* (doador); **2** - Injeção de mRNA (GFP-*nanos1* 3'UTR) em blastodisco no estágio de uma célula de embriões de *Prochilodus lineatus* ou *Astyanax altiparanae* (doador); **3** - Desova e fertilização e triploidização de embriões de *Astyanax altiparanae* (fêmea) x *Astyanax fasciatus* (macho) (receptor); **4** - Dissociação de blastômeros (doador); **5** - Acompanhamento do desenvolvimento embrionário por meio do grupo controle até o estágio de segmentação, momento do transplante (doador); **6** - Transplante de PGC GFP positiva de *Prochilodus lineatus* ou *Astyanax altiparanae* para embrião em estágio de blástula de *Astyanax* híbrido triploide. .... 69

**Figura 2:** Embriões triploides transplantados com PGCs GFP positivas de *A. altiparanae*, cultivadas em solução salina. **A e B** - Embriões com 20 somitos. **C e D** - Embrião na fase de eclosão. **E** - Detalhe da região destacada em **D**. (PGCs, ponta da seta). **B e D** são imagens capturadas sob fluorescência de **A e C**, respectivamente. . 76

**Figura 3:** Embriões híbridos triploides transplantados com PGCs GFP positivas de *A. altiparanae*, cultivadas em solução salina. **A e B** - Embriões em fase de gástrula com 30% de epibolia. **C e D** - Embriões em fase de gástrula com 90% de epibolia. **E e F** - Embriões com 16 somitos. **G e H** - larvas com 1 dia pós-eclosão. (PGCs, ponta da seta). **B, D, F e H** são imagens capturadas sob fluorescência de **A, C, E e G**, respectivamente. .... 77

**Figura 4:** Embriões triploides transplantados com PGCs de *A. altiparanae*, cultivadas em meio de cultivo celular suplementado. **A e B** - Embriões em fase final de blástula. **C e D** - Embriões em fase de gástrula com 90% de epibolia. **E e F** - Embriões com 12 somitos. **G e H** - Embriões na eclosão. **I** - Detalhe da região destacada em **H**. (PGCs, ponta da seta). **B, D, F e H** são imagens capturadas sob fluorescência de **A, C, E e G**, respectivamente. .... 78

**Figura 5:** Embriões híbridos triploides transplantados com PGCs de *A. altiparanae*, cultivadas em meio de cultivo celular suplementado. **A e B** - Embriões em fase inicial de gástrula. **C e D** - Embriões com 8 somitos. **E e F** - Embriões na eclosão. **G** - Detalhe da região destacada em **F**. **H e I** - Larva com 1 dia pós-eclosão. **J** - Detalhe da região destacada em **I**. (PGCs, ponta da seta). **B, D, F e I** são imagens capturadas sob fluorescência de **A, C, E e I**, respectivamente..... 79

**Figura 6:** Embriões híbridos triploides transplantados com PGCs GFP positivas de *P. lineatus*, cultivadas em meio salino. **A e B** - Embriões em fase de gástrula como 30% de epibolia. **C e D** - Embriões em fase de gástrula como 90% de epibolia. **E e F** - Embriões como 8 somitos. **G e H** - Larva com 1 dia pós-eclosão. (PGCs, ponta da seta). **B, D, F e H** são imagens capturadas sob fluorescência de **A, C, E e G**, respectivamente. .... 83

**Figura 7:** Embriões híbridos triploides transplantados com PGCs GFP positivas de *P. lineatus*, cultivadas em meio suplementado. **A e B** - Embrião em fase blástula. **C e D** - Embrião em fase de gástrula como 80% de epibolia. **E e F** - Embrião como 6 somitos. **G e H** - Embrião na eclosão. **I** - Detalhe da região destacada em **H**. (PGCs, ponta da seta). **B, D, F e H** são imagens capturadas sob fluorescência de **A, C, E e G**, respectivamente. .... 84

### Capítulo III

**Figura 1:** Gel de agarose a 2% na avaliação dos primers desenhados em amostra de cDNA de oócito de *Astyanax altiparanae*. L - Ladder 1 kb plus (Invitrogen); 1 - ubiquitin; 2 - buckyball; 3 - cxcr4b; 4 - cyclin B1; 5 - dazl; 6 - ddx4; 7 - dnd1; 8 - nanos. .... 103

**Figura 2:** Alinhamento das sequências e identidade dos produtos de amplificação com a mesma região vinda de *A. mexicanus*. **A** - ubiquitin; **B** - cxcr4b; **C** - cyclin B1; **D** - dazl; **E** - ddx4; **F** - dnd1; **G** - nanos. .... 104

**Figura 3:** Gel de 2% na análise de PCR da expressão gênica utilizando cDNA de oócito e células germinativas primordiais em diferentes condições de cultivo de *Astyanax*

*altiparanae*. L – Ladder 1 kb plus (Invitrogen); 1 – oócito; 2 – PGC – meio salino; 3 – PGC – meio suplementado..... 105

**Figura 4:** Gráfico das amplificações da curva padrão e amostras de PGCs por PCR tempo real de *Astyanax altiparanae* para os genes **A** – ubiquitin; **B** – buckyball; **C** – *cxcr4b*; **D** – *cyclinb1*; **E** – *dazl*; **F** – *ddx4*; **G** – *dnd1*; **H** – *nanos*. ..... 106

**Figura 5:** Curva Padrão de *Astyanax altiparanae* para os genes **A** – ubiquitin; **B** – buckyball; **C** – *cxcr4b*; **D** – *cyclin B1*; **E** – *dazl*; **F** – *ddx4*; **G** – *dnd1*; **H** – *nanos*. ..... 107

**Figura 6:** Curvas de melting dos produtos de amplificações de *Astyanax altiparanae*, para os genes **A** - *ubiquitin*, **C** - *buckyball*, **D** – *cxcr4b* e **F** – *cyclin B1*. Ao lado das curvas se encontram as imagens dos géis de agarose dos produtos de amplificação do PCR em tempo real **B** – *ubiquitin*, **E** – *cxcr4b*, **G** – *cyclin B1*. 1- PGC – meio salino; 2- PGC- meio suplementado. .... 108

**Figura 7:** Curvas de melting dos produtos de amplificações de *Astyanax altiparanae*, para os genes **A** - *dazl*, **C** – *ddx4*, **E** – *dnd1* e **G** – *nanos*. Ao lado das curvas se encontram as imagens dos géis de agarose dos produtos de amplificação do PCR em tempo real **B** – *dazl*, **D** – *ddx4*, **F** – *dnd1*, **H** - *nanos*. 1- PGC – meio salino; 2- PGC- meio suplementado. .... 109

**Figura 8:** Gráfico de expressão relativa dos genes *cxcr4b*, *cyclin B1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos* em amostras de células germinativas primordiais de *Astyanax altiparanae* em diferentes condições de cultivo. PGCs vinda do meio salino foi usada como calibrador da expressão. .... 111

**Figura 9:** Gel de agarose a 2% na análise de PCR semi-quantitativa da expressão genica utilizando cDNA de tecidos de *Astyanax altiparanae*. **A** – *b-actina*; **B** – *buckyball*; **C** – *cxcr4b*; **D** – *cyclin B1*; **E** – *dazl*; **F** – *ddx4*; **G** – *dnd1*; **H** – *nanos*, ..... 112

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 12  |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 30  |
| <b>3. ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA TESE</b> .....   | 31  |
| Referências .....   | 34  |
| <br>  |     |
| <b>4. CAPITULO I: RASTREAMENTO DE CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS</b> .....                   | 44  |
| Resumo .....  | 44  |
| 4.1. Material e Métodos .....   | 45  |
| 4.2. Resultados .....   | 50  |
| 4.3. Discussão .....  | 57  |
| Referências .....   | 61  |
| <br>  |     |
| <b>5. CAPITULO II: TRANSPLANTE DE CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS</b> .....                   | 63  |
| Resumo .....  | 63  |
| 5.1. Material e Métodos .....   | 64  |
| 5.2. Resultados .....   | 70  |
| 5.3. Discussão .....  | 85  |
| Referências .....   | 92  |
| <br>  |     |
| <b>6. CAPITULO III: AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DE GENES MARCADORES EM CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS</b> ..... | 95  |
| Resumo .....  | 95  |
| 6.1. Material e Métodos .....   | 96  |
| 6.2. Resultados .....   | 103 |
| 6.3. Discussão .....  | 112 |
| Referências .....   | 120 |
| <br>  |     |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | 124 |
| <br>  |     |
| <b>APÊNDICE A - REMOÇÃO DE CORION</b> .....   | 129 |
| <b>APÊNDICE B - MICROINJEÇÃO DE mRNA</b> .....  | 130 |
| <b>APÊNDICE C - DISSOCIAÇÃO DE BLASTOMEROS</b> .....  | 131 |
| <b>APÊNDICE D - TRANSPLANTE DE PGCs</b> .....   | 132 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes são as formas de vidas que predominam no ambiente aquático entre os grupos de vertebrados, sendo descritas mais de 35.000 espécies (FRICKE; ESCHMEYER; VAN-DER-LAAN, 2020), e ainda muitas espécies não foram catalogadas. A região neotropical abriga a maior ictiofauna de água doce conhecida, com aproximadamente 5.160 espécies (FROESE; PAULY, 2015; REIS et al., 2016), concentrando no Brasil mais de 3.600 espécies (ICMBIO/MMA, 2018). As ordens que apresentam maior diversidade e distribuição na região neotropical são os Siluriformes, representados pelos bagres e cascudos, com 1.915 espécies e da ordem Characiformes com 1.700 espécies (CASTRO; VARI, 2003; NELSON, 2016; REIS et al., 2016), incluindo espécies de grande importância socioeconômica na produção da aquicultura mundial, bem como espécies listadas em ameaça de extinção (ALVES et al., 2014; FROESE; PAULY, 2015; ICMBIO/MMA, 2018; NAKATANI et al., 2001).

A aquicultura, relacionada ao cultivo de organismos aquáticos, é uma atividade desenvolvida no mundo inteiro e considerada a atividade agropecuária que mais cresceu globalmente nas últimas décadas. A produção mundial expandiu em média anual de 5,3% no período de 2001 a 2018, atingindo a marca de 82,1 milhões de toneladas (FAO, 2020). A piscicultura brasileira cresceu 4,9% em 2019, com aproximadamente 758.000 toneladas produzidas. Os peixes nativos representaram 38% da produção nacional (PEIXEBR, 2018).

Embora exista uma grande diversidade de espécies e grandes investimentos na produção de pescado, várias espécies encontram-se ameaçadas de extinção. Ações antrópicas como degradação de habitats, sobre pesca, introdução de espécies exóticas, desmatamento das matas ciliares e

poluição doméstica, industrial e da agropecuária (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005; MIRANDA, 2012; TOLUSSI et al., 2018) são os principais fatores causadores de impactos sobre as populações de peixes no ambiente natural. A intensificação destas ações têm contribuído para o aumento do número de espécies de teleósteos no Livro Vermelho de Espécies Ameaçadas de Extinção, sendo encontrado atualmente 52 espécies da ordem Characiformes e 91 espécies de Siluriformes (ICMBIO/MMA, 2018)

Cada espécie apresenta características genéticas e importância ecológica únicas, o que enfatiza, portanto, a preocupação com a conservação e a necessidade de desenvolvimento de biotecnologias que atuem na conservação e reconstituição de espécies ameaçadas, bem como auxiliem as práticas produtivas.

Desta forma, algumas estratégias têm sido empregadas para conservação de peixes, dentre elas se destaca a criação de bancos genéticos *ex situ*, através da criopreservação de diversos tipos celulares, como células germinativas primordiais (HIGAKI et al., 2010; KAWAKAMI et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2007; YASUI et al., 2011), oogônias tronco (HIGAKI et al., 2018), espermatogonia tronco (FRANĚK et al., 2019; LEE; YOSHIZAKI, 2016) e espermatozoide (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; VIVEIROS et al., 2012a, 2012b), para posterior utilização na propagação mediada.

O emprego de células germinativas primordiais (PGC – do inglês - primordial germ cells) em bancos genéticos e reconstituição de espécies tornou-se uma abordagem bastante promissora, por serem células precursoras de toda linhagem germinativa e subsequente formação de gametas, além de preservar constituintes maternos, como germoplasma e DNA mitocondrial (GOTO; SAITO,

2019; SIQUEIRA-SILVA et al., 2018; YAMAHA et al., 2007; YOSHIZAKI et al., 2003).

As PGCs podem ser transplantadas para um organismo receptor estéril, gerado por técnicas de manipulação cromossômica (ADAMOV et al., 2016; ARAI, 2001; ARAI; FUJIMOTO, 2013; NASCIMENTO et al., 2017a) para geração de quimera germinativa (SAITO et al., 2008; YAMAHA et al., 2003, 2007; YASUI et al., 2011), em que a espécie hospedeira produzirá gametas a partir de PGCs doadas (xenogênese). Essa tecnologia é potencialmente aplicável para a conservação de genótipos ameaçados ou raros, e ainda naqueles de grande valor comercial.

### **1.1. Quimerismo em Peixes**

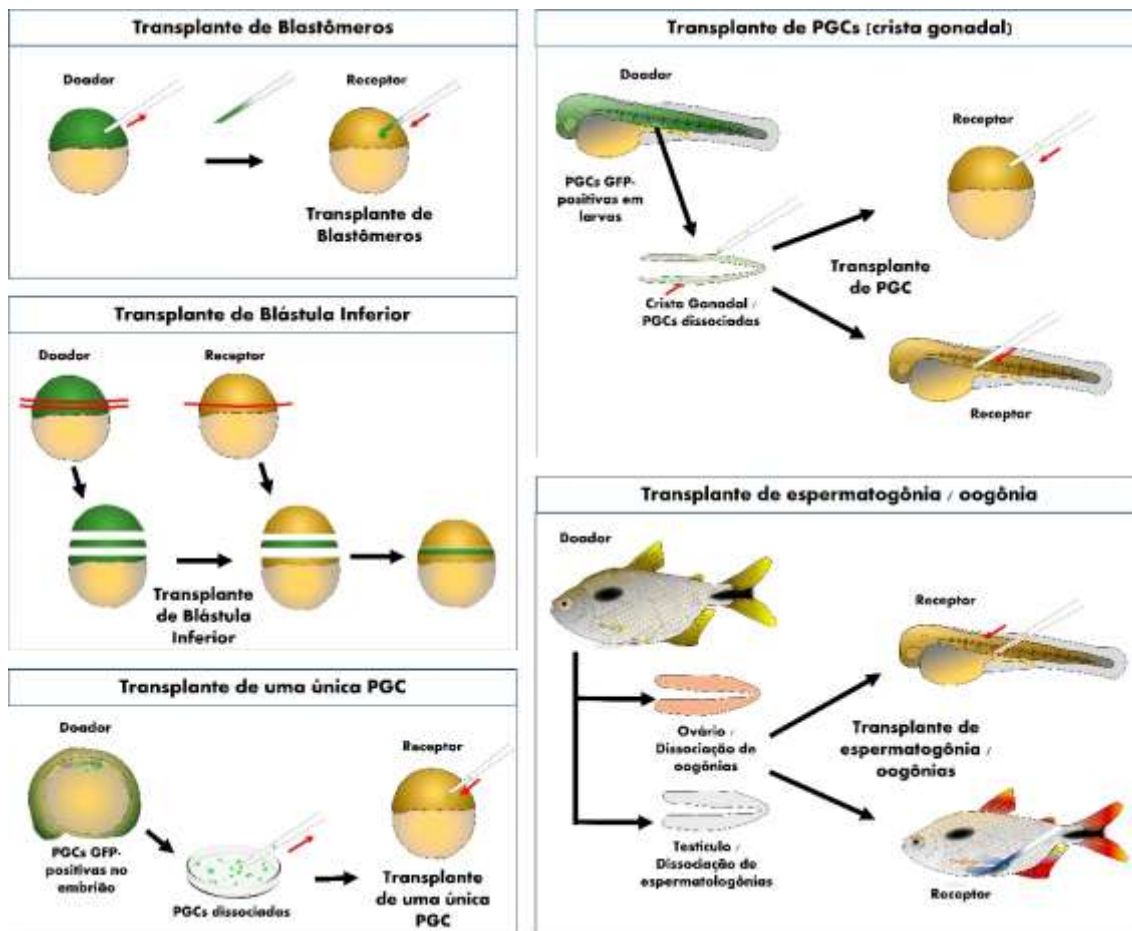
O conceito de quimerismo foi introduzido pela mitologia grega fazendo menções a criaturas composta por partes de vários animais. Atualmente, este termo é utilizado para se referir a indivíduos que apresentam coexistência de células provindas de zigotos diferentes (ROSSANT et al., 1982). Em quimeras somáticas, órgão, tecidos e células de organismos doadores fazem parte do corpo dos receptores sem interferir na produção de gametas. No caso da produção de quimeras germinativas, o intuito é a obtenção de gametas provenientes de organismo doador, para isso, espécies receptoras recebem transplante de células germinativas de um doador, que desenvolvem nas gônadas e produzem gametas da espécie doadora.

A propagação heteróloga de gametas via quimeras germinativas em peixes pode ser empregada como uma ferramenta para a propagação de

espécies na qual a reprodução é mais crítica, como espécies ameaçadas, de alto valor comercial ou com longo período de maturação gonadal (ROBLES et al., 2017; SIQUEIRA-SILVA et al., 2018). Células germinativas de peixes de difícil manejo reprodutivo podem ser transplantadas para embriões de espécies com protocolos de reprodução bem estabelecidos (NAKAGAWA; KOBAYASHI; UENO, 2002; TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUSHI, 2004; YAMAHA et al., 2007). Dessa forma, atividades como manutenção em cativeiro e reprodução dos animais, estariam relacionadas à espécie receptora, geralmente espécies domésticas ou de laboratório, trazendo grandes vantagens para a aplicação em piscicultura e conservação (YAMAHA et al., 2007).

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas para geração de quimeras germinativas em peixes, incluindo o transplante de diferentes tipos celulares, como PGCs embrionárias e espermatogônias e oogonias-tronco provindas de adultos. Em relação aos receptores, além dos requisitos de espécie mencionados anteriormente, pode ocorrer também o transplante em diferentes fases do desenvolvimento, tais como embriões em estágio de blástula (SAITO et al., 2008; YASUI et al., 2011), larvas recém-eclodidas (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUSHI, 2004) e peixes sexualmente maduros (LACERDA et al., 2006) (Fig.1).

**Figura 1:** Principais metodologias de transplante de células germinativas primordiais (PGCs), espermatogônias (SPG) e oogônias (OOG) para receptores em fase de blástula, larva e adultos relacionadas em peixes



A eficiência do transplante de células germinativas para geração de quimeras germinativas visando a propagação mediada requer a prévia esterilização do receptor. A infertilidade das espécies receptoras contribui para diminuição da competição entre células germinativas do endógenas e transplantadas. Diversos métodos foram desenvolvidos para tal esterilização, e os níveis de esterilidade podem diferir entre as técnicas empregadas, sexo e as espécies. Dentre as metodologias empregadas para esterilização de peixes incluem: manipulação cromossômica para produção de receptores triploides, na qual ocorre a retenção do segundo corpúsculo polar e geralmente, produzem indivíduos estéreis, pois a presença de três conjuntos de cromossomos afeta

adversamente a meiose (ADAMOV et al., 2016; CAL et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2017a; TAKEUCHI et al., 2018). A esterilização química por tratamentos com busulfan que interferem na divisão celular, é uma metodologia que atua na depleção das células germinativas endógenas (LACERDA et al., 2010; NÓBREGA et al., 2010; SIQUEIRA-SILVA et al., 2015). A inibição da tradução de mRNA por meio de microinjeções de morfolidos, oligonucleotídeo antisense, pode induzir a esterilidade quando os genes alvos são essenciais para manutenção, diferenciação e migração das PGCs (CIRUNA et al., 2002; HIGAKI et al., 2010; SAITO et al., 2008). Alternativamente, a hibridização interespecífica pode ser usada para esterilização, uma vez que geralmente produzem indivíduos estéreis, devido a incompatibilidade de genes (WONG et al., 2011; YAMAHA et al., 2003; YOSHIKAWA et al., 2018).

Os procedimentos de micromanipulação vem sendo realizado em espécies modelos ou laboratoriais, incluindo *Danio rerio* (LIN et al., 1992), *Oryzias latipes* (WAKAMATSU et al., 1993) e o *Misgurnus anguillicaudatus* (YASUI et al., 2011). No entanto, tem sido relatado também o transplante em espécies empregadas na piscicultura, como carpas (YAMAHA et al., 2001), salmonídeos (YOSHIZAKI et al., 2005) e esturjão (SAITO; PSENICKA, 2015).

Inicialmente, LIN e colaboradores (1992) realizaram transplante de blastômeros de *Danio rerio* selvagem para receptores de *D. rerio* albino em estágio de blástula intermediária, sendo avaliados 28 peixes transplantados, e obtido 5 descendentes com a presença de pigmentação. A mesma abordagem foi realizada para *M. anguillicaudatus* (NAKAGAWA; KOBAYASHI; UENO, 2002), *O. mykiss* (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2001), *O. latipes* (LI et al., 2016) e *Sander lucioperca* (GÜRALP et al., 2017). Seguindo a linha de transplante de blastômeros, YAMAHA et al., 2001, 2003 induziram o quimerismo

pelo transplante da parte inferior da blastoderme em *C. carassius* e *C. carpio* tendo como receptor *C. auratus*.

Com o propósito de aumentar a eficiência na produção de quimeras germinativas, Saito et al., (2008), isolou e transplantou PGCs marcadas com mRNA sintetizado *in vitro*, de *D. albolineatus*, *C. auratus* e *M. anguillicaudatus* para embriões receptores de *D. rerio*. Esta metodologia emprega a microinjeção do RNA sintético proveniente da fusão do gene repórter GFP (proteína fluorescente verde) com a sequência reguladora de tradução da região 3' não traduzida (3' UTR) proveniente do cDNA de *nanos1* ou de mRNA específico de PGCs. Desta forma, a região reguladora de tradução permite que o repórter (GFP) seja traduzido diferencialmente nas PGCs, permitindo que estas células sejam distinguidas dos outros tipos celulares, através da fluorescência em determinada fase do desenvolvimento, geralmente entre final de gástrula e fases iniciais de segmentação, entre 3 a 10 somitos. Nesta fase, as outras células dos embriões perdem a fluorescência, enquanto é mantida em PGCs.

A utilização desta metodologia aumentou o número de quimeras com desenvolvimento normal, sendo obtido cerca de 40% a mais na eficiência no transplante. Foi realizado o transplante de PGCs isoladas para receptores em fase de blástula de enguia japonesa (SAITO et al., 2011), *M. anguillicaudatus* (YASUI et al., 2011) e *D. rerio* (HIGAKI et al., 2010; KAWAKAMI et al., 2010). Takeuchi e colaboradores (2003) isolaram PGCs da crista gonadal de larvas recém eclodidas e transplantaram em embriões na fase de blástula, gástrula e larva recém-eclodida. Foi comparado o transplante entre as três fases distintas do receptor, no qual as larvas recém eclodidas apresentaram maior sobrevivência e embriões portadores de células GFP-positivas (21,6%).

Saito et al., (2010) avaliaram os métodos de transplante de blastômeros e de PGC, sendo observado no transplante de blastômeros uma baixa transferência de PGC, enquanto que no transplante de uma única PGC, em todas as combinações de espécies usadas, as PGCs transplantadas migraram em direção à região da crista gonadal do embrião receptor, em taxa comparativamente alta, independentemente da relação filogenética do doador e da espécie hospedeira.

Outras metodologias de transplante de células germinativas foram desenvolvidas para produção de quimeras, tais como o transplante de espermatogonias-tronco (espermatogônias A) (FRANĚK et al., 2019; LACERDA et al., 2006) e oogonias-tronco (PŠENIČKA et al., 2015; YOSHIZAKI et al., 2010), para receptores em fase pós-eclosão e adultos.

Dentre as técnicas de transplante de células germinativas, as PGCs apresentam maior potencial por serem precursoras de toda a linhagem germinativa e responsáveis por toda a herança genética e perpetuação de espécies por meio da fertilização, possibilitando a geração de novos indivíduos. Por este motivo, têm sido utilizadas em diversos trabalhos envolvendo bancos genéticos (CIRUNA et al., 2002; SAITO et al., 2008; TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2003; YASUI et al., 2011).

A realização do transplante de PGCs necessita de conhecimentos prévios de reprodução e desenvolvimento embrionário do doador e receptor (ARASHIRO et al., 2018), incluindo a caracterização da origem, especificação e rota de migração de PGCs nas diferentes espécies (LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014; SAITO et al., 2006; GURALP et al., 2017), para a aplicação bem-sucedida da tecnologia de produção de quimera germinativa (GOTO; SAITO, 2019;

YAMAHA et al., 2010; YASUI et al., 2011; SAITO et al., 2011; YOSHIZAKI et al., 2003).

As PGCs podem ser rastreadas *in vitro* usando diferentes procedimentos, incluindo observações histológicas e por expressão de genes específicos da linhagem germinativa por meio de técnicas de hibridização *in situ* em tecidos ou organismos inteiros (BLASER et al., 2006; BRAAT; SPEKSNIJDER; ZIVKOVIC, 1999; FERNÁNDEZ et al., 2015; FUJIMOTO et al., 2006; OTANI et al., 2002; YOON; KAWAKAMI; HOPKINS, 1997). No entanto, usando tais abordagens, as células devem ser mortas e fixadas, perdendo a capacidade de transplante, o que sugere um procedimento *in vivo*, ou seja, sem a morte dos embriões e de modo que a célula possa ser rastreada, tanto para a coleta quanto para o desenvolvimento no embrião receptor. Para isso, pode ser realizada injeção de mRNA artificial construído pela combinação de uma sequência de proteína fluorescente verde (GFP) com o *nanos1* 3'UTR (GÜRALP et al., 2017; LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014; SAITO et al., 2006; YAMAHA et al., 2010) que irá expressar a proteína fluorescente verde (GFP) apenas nas células germinativas primordiais, que poderão ser evidenciadas por microscopia de fluorescência. Tal procedimento permite a visualização das PGCs e o estudo *in vivo* dos mecanismos de migração e diferenciação, bem como investigar a eficácia da produção de uma quimera da linha germinativa.

## **1.2. Células Germinativas Primordiais**

As células germinativas primordiais são células embrionárias precursoras de toda a linhagem germinativa e da subsequente formação dos gametas,

incluindo espermatozoides e oócitos, proporcionando a continuidade da vida entre as gerações (GRIMALDI; RAZ, 2019; YAMAHA et al., 2007; YOSHIZAKI et al., 2003). Isto significa que as PGCs são responsáveis pela transmissão da herança genética para as gerações futuras, dando origem as novos organismos por meio da fertilização (ROBLES et al., 2017; YOSHIZAKI et al., 2003).

A linhagem germinativa pode ser distinguida dos tipos de células somáticas por suas propriedades estruturais durante o desenvolvimento embrionário inicial, sendo caracterizadas histologicamente como células arredondadas, tamanho relativamente grande (10-20  $\mu\text{m}$ ), núcleo grande (6-10  $\mu\text{m}$ ), membrana nuclear clara, que contém estruturas granulares eletrodensas e um contorno irregular (BRAAT; SPEKSNIJDER; ZIVKOVIC, 1999; NAGAI; YAMAHA; ARAI, 2001; YAMAHA et al., 2010; YÖN; AKBULUT, 2015). As PGCs podem apresentar alterações morfológicas, dependendo da fase de migração em que são observadas. Durante o processo de migração as PGCs podem apresentar forma ameboide, núcleo com contorno irregular e apresentando projeções citoplasmáticas denominadas pseudópodes (BRAAT; SPEKSNIJDER; ZIVKOVIC, 1999; GRIMALDI; RAZ, 2019; YÖN; AKBULUT, 2015).

A origem das PGCs acontece no início do desenvolvimento embrionário, normalmente em locais diferentes de onde a gônada se desenvolve. Essa distância indica que após o estabelecimento de uma linhagem germinativa, as PGCs migram de sua posição inicial em direção as gônadas em formação (GRIMALDI; RAZ, 2019; RAZ, 2003). Os mecanismos de motilidade e orientação são geralmente conservados entre as espécies e integrado por sinais de quimiocinas de células somáticas, ocorrendo migração em diferentes tecidos em desenvolvimento dentro de um mesmo embrião e podendo seguir rotas de

migração distintas em diferentes animais (DOITSIDOU et al., 2002; GRIMALDI; RAZ, 2019; YAMAHA et al., 2007).

A especificação da linhagem germinativa ocorre pela herança de determinantes citoplasmáticos fornecidos maternamente, denominados plasma germinativo, que consiste em agregado de mitocôndrias, fibrilas, proteínas e mRNAs que atuam como reguladores traducionais. As PGCs são os primeiros tipos celulares especificados a partir de células embrionárias indiferenciadas (GOTO; SAITO, 2019; GRIMALDI; RAZ, 2019; YÖN; AKBULUT, 2015).

Os RNAs e proteínas presentes no citoplasma de PGCs, como *ddx4* e *nanos* são identificados como determinantes maternos, sendo de grande importância para a diferenciação e desenvolvimento das PGCs e subsequentemente da linha germinativa, e podem ser usados como marcadores para especificar PGC (YÖN; AKBULUT, 2015). Outros genes como *cxcr4*, *dazl*, *dnd1*, *buckyball* também são necessários para formação, desenvolvimento e migração de PGCs.

Em diversas espécies de teleósteos estão sendo realizados estudos sobre a função e relação de mRNAs fornecidos maternamente e que são encontrados e transmitidos para as PGCs (BONTEMS et al., 2009; DOITSIDOU et al., 2002; GROSS-THEBING et al., 2017; HERPIN et al., 2008; LI et al., 2016; WEIDINGER et al., 2003). Comumente, é utilizado como marcador de células germinativas a fusão das sequências da região codificante de proteína fluorescente e da região reguladora 3'UTR de genes específicos de PGCs, como *nanos* e *ddx4*, para estudos de identificação, migração e transplante de células (LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014; SAITO et al., 2006, 2011; YASUI et al., 2011), uma vez que, esses genes são amplamente conservados entre os grupos de Teleósteos e especificamente expressos em PGCs, sendo a região 3' UTR

responsável pela localização do mRNA nessas células (KOPRUNNER et al., 2001; MISHIMA et al., 2006; SAITO et al., 2011).

O padrão de expressão de *ddx4* durante a formação e migração de PGCs foi relatado *in vitro* por meio da técnica Whole Mount In Situ Hybridization (WISH) para espécies, como *Oryzias latipes* (SHINOMIYA et al., 2000), *Oncorhynchus mykiss* (YOSHIZAKI et al., 2000), *Danio rerio* (YOON; KAWAKAMI; HOPKINS, 1997), *Carassius auratus* (OTANI et al., 2002) e *Misgurnus anguillicaudatus* (FUJIMOTO et al., 2006), sendo relatada a distribuição de sinais de *ddx4* em todo o blastodisco, com agregação de sinais desde os primeiros sulcos de clivagem. Padrões semelhantes foram descritos para *Danio rerio* utilizando sonda de RNA antisense *nanos1* (KOPRUNNER et al., 2001) e *Gadus morhua* L. utilizando *nanos3* (PRESSLAUER et al., 2012), com origem da expressão do gene detectada a partir das primeiras clivagens. Entretanto ao contrário de *ddx4* que continua a ser fortemente expressos ao longo do desenvolvimento das PGCs, a expressão de *nanos1* não foi detectada pela hibridização *in situ* no quinto dia de desenvolvimento embrionário (KOPRUNNER et al., 2001), enquanto a expressão de *nanos3* não foi mais detectada a partir da somitogênese inicial (PRESSLAUER et al., 2012).

Por meio de marcações *in vivo* foi possível observar expressão de *nanos* e conseqüentemente a migração de PGCs em *Tinca tinca* (LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014), *Leucopsarion petersii*, *Oryzias latipes*, *Carassius auratus*, *Danio rerio*, *Danio albolineatus*, *Clupea pallasii*, *Misgurnus anguillicaudatus* (SAITO et al., 2006) e *Anguilla japonica* (SAITO et al., 2011). Esses estudos demonstram funções conservadas e a importância de ambos os genes na formação, adequada migração e sobrevivência de PGCs, enfatizando também especificidade dos genes relacionados a linhagem celular.

Outro gene com função conservada entre as espécies de peixes, é o *buckyball*, um regulador na formação do plasma germinativo. Na ausência de expressão desse gene, o plasma germinativo falha em se agregar durante os estágios embrionário, e os oócitos perdem a polaridade durante a oogênese (BONTEMS et al., 2009; FLORENCE L. MARLOW; MULLINS, 2009).

O sistema quimioatraente *sdf-1a/cxcr4b* é responsável pelo direcionamento normal das PGCs em direção à crista gonadal. As PGCs são guiadas por orientações atraentes e repulsivas, estando correlacionado com o ligante quimiocina *sdf-1a* expresso em células somáticas e seu receptor *cxcr4b* que se localiza em PGCs (GRIMALDI; RAZ, 2019; PAKSA; RAZ, 2015; RAZ; REICHMAN-FRIED, 2006). Em níveis reduzidos de expressão *sdf-1a/cxcr4b* as PGCs podem manter o comportamento móvel, entretanto são direcionadas a locais ectópicos (DOITSIDOU et al., 2002; HERPIN et al., 2008).

O gene *dnd1* está envolvido na manutenção e destino de PGCs, sendo importante para o desenvolvimento da linha germinativa. Estudos com zebrafish demonstram que PGCs podem sofrer apoptose em embriões com depleção de *dnd* (WEIDINGER et al., 2003) entretanto, algumas PGCs com migração ectópicas por ausência de *dnd* podem apresentar morfologia similar a outros tipos de células ou formação de tumores (GROSS-THEBING et al., 2017). *Gadus morhua* (Atlantic cod (*Gadus*), o knockdown de *dnd* causou uma diminuição nos níveis de expressão de *ddx4* e *nanos3* (SKUGOR; TVEITEN; KRASNOV, 2014)

Assim como os demais genes, o *dazl* tem funções conservadas na migração de PGCs e proliferação de células germinativas. A ausência desse gene está fortemente associada a infertilidade em diferentes modelos animais, inclusive em humanos (LI et al., 2016; XU; MOORE; REIJO PERA, 2001; XU et al., 2009).

Nas espécies modelos, as quais são bastante estudadas e frequentemente mais empregadas as biotecnologias avançadas, como em salmonídeos e “zebrafish”, as funções e padrões de expressão desses genes são melhores elucidados, demonstrando a importância na especificação e manutenção das PGCs durante o desenvolvimento, (FLORENCE L. MARLOW; MULLINS, 2009; JIN; DAVIE; MIGAUD, 2019; LI et al., 2016; PRESSLAUER et al., 2012; SASADO et al., 2008). Embora as evidências indiquem papéis essenciais dos genes na manutenção de PGCs e no desenvolvimento da linhagem germinativa primordial, nas espécies nativas as informações ainda são escassas sobre a caracterização do comportamento e função desses genes, o que é de grande interesse no desenvolvimento de biotecnologias para a esterilização e transplante de células germinativas nestas espécies.

Por se tratar de tecnologias inovadoras e de difícil consolidação, uma das estratégias é utilizar como modelo biológico espécies de fácil manutenção e reprodução. Portanto, o estudo das PGCs, tanto na parte molecular quanto às suas características morfofuncionais, dependem de espécies-modelo para a sua realização. A seguir, serão descritas algumas características de tais espécies modelos.

### **1.3. Espécies Modelo**

O desenvolvimento de protocolos de quimeras de linhagem germinativa é de grande importância e considerado boa alternativa para conservação e reconstituição de espécies ameaçadas de extinção. Entretanto, antes de aplicar tais técnicas em espécies ameaçadas é importante desenvolver a tecnologia

inicialmente em organismos de fácil reprodução, larvicultura e manutenção, além de precocidade e capacidade reprodutiva. Estudos em espécies domésticas geralmente dão suporte para estudos mais avançados em espécies mais críticas, como é o caso de peixes ameaçados de extinção. A escolha de espécies filogeneticamente próximas, para a subsequente transferência de tecnologias para espécies mais críticas geralmente otimiza a consolidação de tecnologias tais como o quimerismo e servem de modelo experimental para os estudos em peixes nativos.

Os estudos em células germinativas primordiais e transplantes para embrião realizados neste trabalho teve como espécies modelo *Astyanax altiparanae*, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus*, que são espécies já consolidadas na aquicultura, com diversos trabalhos de reprodução (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005; YASUI et al., 2015; ANDRADE; YASUI, 2003; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; DE AZEVEDO, 2006; URBINATI; GONÇALVES; TAKAHASHI, 2010) e nutrição (HAYASHI et al., 2004; ANTONIO et al., 2007; URBINATI; GONÇALVES; TAKAHASHI, 2010).

As espécies do gênero *Astyanax* são conhecidas popularmente como “lambari” e “tambiú”. A espécie *Astyanax altiparanae*, utilizada no estudo, passa por uma proposta de alteração do nome para *Astyanax lacustris* (LUCENA; SOARES, 2016), mas esta revisão ainda não é consenso na comunidade científica. Desta forma, neste trabalho preconizou-se pela manutenção da classificação anterior até que seja estabelecida por completo a nova nomenclatura.

Esta espécie é encontrada nos rios e córregos da bacia do alto rio Paraná, Brasil. De pequeno porte, atingindo de 5-20 cm de comprimento e até 60 g de peso, quando adulto (LOBON-CERVIA; BENNEMANN, 2000; PORTO-

FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005). Apresentam hábito alimentar onívoro, aceitando bem rações comerciais em cativeiro (HAYASHI et al., 2004). A maturação gonadal é precoce, com quatro meses, esta espécie atinge a fase adulta, iniciando a reprodução. É uma espécie com alta fecundidade e de fácil larvicultura (GARUTTI, 2003; PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005; YASUI et al., 2020). Nesta espécie, o período reprodutivo é intermitente e apresenta desova do tipo parcelada. Os machos possuem dimorfismo na nadadeira anal, com inúmeras espículas ósseas, resultando em uma aspereza sendo uma característica muito utilizada para a sexagem (GARUTTI, 2003; LOBON-CERVIA; BENNEMANN, 2000; NASCIMENTO et al., 2017b; PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005).

*Astyanax altiparanae* apresenta facilidade nos procedimentos de fertilização *in vitro*, sendo considerado modelo para desenvolvimento de biotécnicas. Recentemente foram realizadas pesquisas sobre técnicas básicas de reprodução artificial de *A. altiparanae* (YASUI et al., 2014). A partir da reprodução artificial, foram realizados estudos de eventos de fertilização, morfologia e motilidade espermática e desenvolvimento embrionário (PEREIRA-SANTOS et al., 2016). Com este conjunto de informações foi possível consolidar protocolo para indução à triploidia (ADAMOV et al., 2016), que foram confirmados através de um procedimento de citometria de fluxo desenvolvida por nosso grupo (Xavier et al., 2017, Yasui et al., 2020). Para a manutenção em sistema laboratorial, foi realizada a larvicultura (Bertolini et al., 2017), e dessa forma os peixes puderam passar para a fase de juvenil até adulto. Avaliação do desempenho de peixes triploides, demonstrou que apenas as fêmeas triploides eram estéreis (NASCIMENTO et al., 2017a, 2017b). No entanto, os machos, não

eram estéreis, o que levou a produzir híbridos triploides que finalmente resultaram em proles 100% estéreis (PIVA et al., 2017). A esterilidade dos receptores tem sido utilizada como importante fator para o sucesso do transplante de PGC. Baseado nessas etapas prévias, o lambari pode ser considerado um importante modelo experimental para o desenvolvimento de biotécnicas em laboratório.

*Prochilodus lineatus*, conhecido popularmente como “curimba” ou “curimbatá” pertence à família Prochilodontidae, é amplamente distribuída no Paraná, Paraguai e Paraíba do Sul (Brasil, América do Sul), chegando a cerca de 90 cm (CASTRO; VARI, 2003). É uma espécie iliófaga e aceita facilmente dietas artificiais, em ambiente natural é de grande importância ecológica e econômica, sendo considerada uma espécie chave dentro de grandes cadeias tróficas (ANTONIO et al., 2007).

Esta espécie é comumente usada na aquicultura devido ao seu crescimento, aclimação às condições de aquicultura e fácil produção de juvenis. Sua reprodução é dependente a movimentos migratórios, reproduzindo-se durante o período de piracema, que ocorre durante o período de novembro a fevereiro, apresentando desova total (ANDRADE; YASUI, 2003). Em cativeiro pode reproduzir facilmente, sendo necessário a indução hormonal para a ovulação das fêmeas (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; DE AZEVEDO, 2006; PAULA et al., 2014; ITAUSSÚ et al., 2020). Porém sua reprodução fica inviabilizada durante o ano inteiro, concentrando todos os esforços reprodutivos na época de reprodução em seu ambiente natural. A fertilização *in vitro* e subsequente produção de curimbas triploides foi realizada recentemente, o que enfatiza que outros passos importantes e mais avançados podem ser desenvolvidos nesta espécie.

O *Piaractus mesopotamicus*, comumente conhecido como pacu, é encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, bem como nas planícies alagadas ao Centro-Oeste, no Pantanal do Mato Grosso. Apresenta desova total, que ocorre entre outubro e março, com pico em novembro e dezembro. Em cativeiro precisam de estímulo hormonal para a desova. Atinge a maturação sexual com idade variando de 3 a 5 anos (URBINATI; GONÇALVES; TAKAHASHI, 2010; URINATI; YAKAHASI, 2020). Devido a aptidão zootécnica é considerado uma das espécies mais importantes e de alto valor comercial na aquicultura e produção de híbridos de alto desempenho. Híbridos envolvendo serrasalmídeos, como *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum* representam 43,7% da produção brasileira, enfatizando a importância dessas espécies (IBGE, 2016; PEIXE BR, 2020; ROUBACH et al., 2003; URBINATI; GONÇALVES; TAKAHASHI, 2010).

Diante dessas características, pode-se considerar as espécies *A. altiparanae*, *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* com grande potencial para estudos de procedimentos de micromanipulação, servindo como modelo no transplante de células germinativas entre as espécies de peixes Neotropicais, uma vez que outros Characiformes como *Brycon orbignuanus*, *Prochulodus vimboides* e *Myleus tiete* são considerados ameaçados (ICMBIO/MMA, 2018).

## Referências

AOKI, Y.; NAKAMURA, S.; ISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; AOKI, Y.; NAKAMURA, S.; ISHIKAWA, Y.; TANAKA, M. Expression and Syntenic Analyses of Four nanos Genes in Medaka Expression and Syntenic Analyses of Four nanos Genes in Medaka. **Zoological science**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 112–118, 2009.

ASAOKA-TAGUCHI, M.; YAMADA, M.; NAKAMURA, A.; HANYU, K.; KOBAYASHI, S. Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in Drosophila embryos. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 1, n. November, 1999.

BARTON, L. J.; LEBLANC, M. G.; LEHMANN, R. Finding their way: themes in germ cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 42, p. 128–137, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.07.007>>

BHAT, N.; HONG, Y. Cloning and expression of boule and dazl in the Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus* ). **Gene**, [s. l.], v. 540, n. 2, p. 140–145, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.02.057>>

BONTEMS, F.; STEIN, A.; MARLOW, F.; LYAUTEY, J.; GUPTA, T.; MULLINS, M. C.; DOSCH, R. Bucky Ball Organizes Germ Plasm Assembly in Zebrafish. **Current Biology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 414–422, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.038>>

DOITSIDOU, M.; REICHMAN-FRIED, M.; STEBLER, J.; KÖPRUNNER, M.; DÖRRIES, J.; MEYER, D.; ESGUERRA, C. V.; LEUNG, T. C.; RAZ, E. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. **Cell**, [s. l.], v. 111, n. 5, p. 647–659, 2002.

EWEN-CAMPEN, B.; SCHWAGER, E. E.; EXTAVOUR, C. G. M. The molecular machinery of germ line specification. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 3–18, 2010.

GRIMALDI, C.; RAZ, E. Germ cell migration—Evolutionary issues and current understanding. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 100, n. July, p. 152–159, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.11.015>>

GROSS-THEBING, T.; YIGIT, S.; PFEIFFER, J.; REICHMAN-FRIED, M.; BANDEMÉR, J.; RUCKERT, C.; RATHMER, C.; GOUDARZI, M.; STEHLING, M.; TARBASHEVICH, K.; SEGGEWISS, J.; RAZ, E. Primordial Germ Cell Fate by Inhibiting Somatic The Vertebrate Protein Dead End Maintains Primordial Germ Cell Fate by Inhibiting Somatic Differentiation. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 704–714.e5, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.019>>

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

HASHIMOTO, H.; HARA, K.; HISHIKI, A.; KAWAGUCHI, S.; SHICHIJO, N.; NAKAMURA, K.; UNZAI, S.; TAMARU, Y.; SHIMIZU, T.; SATO, M. Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. **Scientific Report**, [s. l.], v. 11, n. 11, 2010.

HERPIN, A.; FISCHER, P.; LIEDTKE, D.; KLUEVER, N.; NEUNER, C.; RAZ, E.; SCHARTL, M. Sequential SDF1a and b-induced mobility guides Medaka PGC migration. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 320, p. 319–327, 2008.

JIN, Y. H.; DAVIE, A.; MIGAUD, H. Expression pattern of nanos, piwil, dnd, vasa and pum genes during ontogenic development in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Gene**, [s. l.], v. 688, p. 62–70, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.078>>

KADYROVA, L. Y.; HABARA, Y.; LEE, T. H.; WHARTON, R. P. Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. [s. l.], v. 1527, p. 1519–1527, 2007.

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. **The International journal of developmental biology**, [s. l.], v. 54, n. 10, p. 1493–1501, 2010.

KEDDE, M.; STRASSER, M. J.; BOLDAJIPOUR, B.; VRIELINK, J. A. F. O.; SLANCHEV, K.; SAGE, C.; NAGEL, R.; VOORHOEVE, P. M.; DUIJSE, J. Van; ØROM, U. A.; LUND, A. H.; PERRAKIS, A.; RAZ, E.; AGAMI, R. RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. [s. l.], v. 134, p. 1273–1286, 2007.

KNAUT, H.; WERZ, C.; GEISLER, R.; BUSCH-NENTWICH, E.; DAHM, R.; FROHNHÖFER, H. G.; GEIGER, H.; GILMOUR, D.; HOLLEY, S.; HOOGE, J.; JÜLICH, D.; MADERSPACHER, F.; MAISCHEIN, H. M.; NEUMANN, C.; NICOLSON, T.; ROEHL, H.; SCHÖNBERGER, U.; SEILER, C.; SÖLLNER, C.; SONAWANE, M.; VAN BEBBER, F.; WEHNER, A.; WEILER, C.; ERKER, P.; HABECK, H.; HAGNER, U.; KAPST, C. E. H.; KIRCHNER, A.; KOBLIZEK, T.; LANGHEINRICH, U.; LOESCHKE, C.; METZGER, C.; NORDIN, R.; ODENTHAL, J.; PEZZUTI, M.; SCHLOMBS, K.; DESANTANA-STAMM, J.; TROWE, T.; VACUN, G.; WALDERICH, B.; WALKER, A.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. **Nature**, [s. l.], v. 421, n. 6920, p. 279–282, 2003.

KOPRUNNER, M.; THISSE, C.; THISSE, B.; RAZ, E. A zebrafish nanos -related gene is essential for the development of primordial germ cells. **Genes & development**, [s. l.], v. 15, p. 2877–2885, 2001.

KUCIA, M.; JANKOWSKI, K.; RECA, R.; WYSOCZYNSKI, M.; BANDURA, L.; ALLENDORF, D. J.; ZHANG, J.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M. Z. CXCR4 – SDF-1 signalling , locomotion , chemotaxis and adhesion. [s. l.], p. 233–245, 2004.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 16, p. 1–16, 2005.

LI, M.; HONG, N.; XU, H.; YI, M.; LI, C.; GUI, J.; HONG, Y. Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 126, n. 5–6, p. 366–381, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2009.02.004>>

LI, M.; ZHU, F.; LI, Z.; HONG, N.; HONG, Y. Dazl is a critical player for primordial germ cell formation in medaka. **Nature Publishing Group**, [s. l.], p. 1–7, 2016.

OKUTSU, T.; YANO, A.; NAGASAWA, K.; SHIKINA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Manipulation of Fish Germ Cell: Visualization, Cryopreservation and Transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 685–693, 2006. Disponível em:

<<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrd/18096?from=CrossRef>>

PRESSLAUER, C.; NAGASAWA, K.; FERNANDES, J. M. O.; BABIAK, I. Expression of vasa and nanos3 during primordial germ cell formation and migration in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **THE**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 1262–1277, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.022>>

QU, L.; WU, X.; LIU, M.; ZHONG, C.; XU, H.; LI, S.; LIN, H.; LIU, X. Gene Expression Patterns Identification and characterization of germ cell genes vasa and dazl in a protogynous hermaphrodite fish, orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Gene Expression Patterns**, [s. l.], v. 35, n. October 2019, 2020.

RAZ, E. Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 690–700, 2003.

RAZ, E.; REICHMAN-FRIED, M. Attraction rules: germ cell migration in zebrafish. **Current Opinion in Genetics and Development**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 355–359, 2006.

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 159–166, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.107.060038>>

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R. I. E.; FUJIMOTO, T.; KAWAKAMI, Y. Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. **The International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 1486, n. October, p. 1481–1486, 2010.

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; KAWAKAMI, Y.; NOMURA, K.; TANAKA, H.; ADACHI, S.; ARAI, K.; YAMAHA, E. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 1–8, 2011.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A. V.; CAMP, E.; LEAL-TASSIAS, A.; ATKINSON, S. P.; ARMSTRONG, L.; DÍAZ-LLOPIS, M.; MULLOR, J. L. Nanog Regulates Primordial Germ Cell Migration Through Cxcr4b. **Stem Cell**, [s. l.], v. 28, p. 1457–1464, 2010.

SASADO, T.; YASUOKA, A.; ABE, K.; MITANI, H.; FURUTANI-SEIKI, M.; TANAKA, M.; KONDOH, H. Distinct contributions of CXCR4b and CXCR7 / RDC1 receptor systems in regulation of PGC migration revealed by medaka mutants kazura and yanagi. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 320, p. 328–339, 2008.

TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Generation of Live Fry from Intraperitoneally Transplanted Primordial Germ Cells in Rainbow Trout. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 1142–1149, 2003.

WEIDINGER, G.; STEBLER, J.; SLANCHEV, K.; DUMSTREI, K.; WISE, C.; LOVELL-BADGE, R.; THISSE, C.; THISSE, B.; RAZ, E. dead end, a Novel Vertebrate Germ Plasm Component, Is Required for Zebrafish Primordial Germ Cell Migration and Survival. **Current Biology**, [s. l.], v. 13, p. 1429–1434, 2003.

XU, H.; LI, M.; GUI, J.; HONG, Y. Cloning and expression of medaka dazl during embryogenesis and gametogenesis. **Gene Expression Patterns**, [s. l.], v. 7, p. 332–338, 2007.

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

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**, [s. l.], v. 89, n. 8, p. 2380–2388, 2011.

YE, H.; YUE, H.; YANG, X.; LI, C.; WEI, Q. Molecular characterization, tissue distribution, localization and mRNA expression of the bucky ball gene in the Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) during oogenesis. **Gene Expression Patterns**, [s. l.], v. 28, n. February 2019, p. 62–71, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gep.2018.02.003>>

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os aspectos apresentados, o presente estudo proporcionou avanços significativos e resultados inéditos no transplante de células germinativas primordiais não apenas em espécies de peixes neotropicais, mas em peixes de forma global. As tecnologias envolvendo micromanipulação de células e embriões, atreladas a reprodução e biologia do desenvolvimento vem sendo alvo de estudo em diferentes grupos de pesquisa, visando o aumento da eficiência na geração de quimeras germinativas. No entanto, mesmo nas espécies mais estudadas, como ciprinídeos e salmonídeos, ainda carecem de estudos adicionais, já que essas técnicas ainda não permitem a pronta aplicação na conservação e produção de peixes. No caso das espécies nativas, o presente trabalho é o primeiro a envolver transplante de PGCs e, portanto, muitos esforços em pesquisa devem ser realizados para a consolidação das técnicas de micromanipulação para geração de quimeras germinativas até o pronto uso em bancos genéticos *ex situ*.

O *Astyanax altiparanae* foi usado como modelo para o estabelecimento e adequação de etapas do transplante de PGCs, uma vez que os procedimentos de reprodução desta espécie foram previamente estabelecidos, bem como as técnicas esterilização de receptores pela manipulação cromossômica, como a indução à triploidia e as etapas de marcação e rota de migração de PGCs. *A. altiparanae* apresentou boa aclimatação as condições de sistema de micromanipulação, o que demonstra ser um importante modelo experimental para o desenvolvimento de biotécnicas na geração de quimera germinativa. Os avanços na consolidação das técnicas envolvidas no presente trabalho, se deve,

em grande parte, à adoção do *A. altiparanae* como espécie modelo, pois trabalhar com uma espécie de aquário permitiu obter maior número de desovas e otimizar a geração das tecnologias.

A eficiência no transplante de PGCs em embriões de peixe inicialmente é avaliada pela correta migração das células doadas para a região de formação da crista gonadal no receptor. Para isso, foi necessária adaptação de protocolos presente literatura e apenas a implementação do cultivo das PGCs em meio de cultivo suplementado, anteriormente ao transplante, resultou na migração direcionada de PGCs doadas.

Levando em consideração esses resultados, foi avaliada a o nível de expressão relativa de genes PGCs-específicos de células cultivadas em diferentes condições, sugerindo que a suplementação do meio de cultivo proporcionou melhores condições para PGCs e subsequente eficácia na migração pós-transplante, além de confirmar que as células isoladas para transplantes eram mesmo células germinativas.

Os procedimentos de micromanipulação e transplante foram avaliados em outras espécies neotropicais, como *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus*. Estas espécies apresentaram bom desenvolvimento em condições laboratoriais, marcação de PGCs e descrição de rota de migração. Entretanto, no transplante utilizando a espécie *P. lineatus* como doador de PGCs, foi verificada apenas a migração ectópica nos receptores avaliados, demonstrando que estudos acerca de migração e manutenção de PGCs podem requerer protocolos espécies-específicos e mudanças na estratégia de transplante.

É necessário ainda, continuar as avaliações do transplante de PGCs em *A. altiparanae*, verificando após a migração direcionada, se as células doadas são capazes de colonizar e formar uma gônada funcional no receptor e assim produzir de fato uma quimera germinativa, gerando descendentes com características genéticas da espécie doadora. Como perspectivas futuras, modificações dos procedimentos de micromanipulação devem ser implementadas. Na etapa de cultivo celular alterações na composição do meio, incluindo o uso de extrato de embrião e a substituição do soro fetal pelo soro de peixe, poderia melhorar as condições de cultivo, propiciando que as PGCs mantenham integras suas características de diferenciação, manutenção e migração. Outra modificação importante que poderia melhorar a eficiência da migração direcionada, seria a alteração no tempo de cultivo celular para a realização do transplante. A identificação precisa das PGCs em diferentes etapas do desenvolvimento, tais como blástula e gástrula, utilizando a região reguladora de tradução 3'UTR, de outros mRNA específicos de PGCs, tais como *buckyball*, *dnd1* e *ddx4*, poderia proporcionar um curto período de cultivo celular para o transplante precoce de PGCs e melhorar as taxas de migração. A produção de organismos geneticamente modificados, que permitam a identificação e transplante de PGCs ainda em fases de migração, auxiliará na otimização da fase ideal de desenvolvimento do doador para o transplante de PGCs.

Em espécies nativas, o próprio procedimento de transplante deve ser alterado em função da taxa de clivagem e velocidade de desenvolvimento embrionário. Por exemplo, nas espécies mais estudadas acerca do quimerismo, o tempo de incubação até que ocorra a eclosão pode levar dias (72 horas – 32

dias), o que sugere que existe uma “janela” maior para se realizar o transplante. No caso de espécies nativas, o tempo de incubação é de algumas horas (11 – 29 horas), portanto, ocorre uma dificuldade de tempo para realização das diferentes etapas do transplante e sincronização de desenvolvimento doador/receptor. Isso sugere estratégias envolvendo menos transplantes por grupo de ovos, e a necessidade de utilizar a criopreservação para ajudar a sincronizar o tempo transplante, podendo ser preferencialmente adotar mudanças na metodologia, optando por realizar transplante de PGCs diretamente na região das cristas gonadais, ou uso de células germinativas tronco (espermatogônias e oogônias), o que também necessita de estudos e avanços para consolidação.

É imprescindível prosseguir com estudos sobre a função dos genes PGC-específicos em espécies nativas. A utilização de técnicas de *in vitro*, como WISH e ISH, podem fornecer a descrição do momento de diferenciação de células germinativas primordiais e as fases do desenvolvimento em que são expressos. A ação dos genes na manutenção e migração das PGCs podem ser acessadas utilizando técnica de microinjeção de morfólino, RNA antisense, pela inibição da tradução, ou ainda por outras técnicas de nocaute gênico. As aplicações de tais tecnologias ainda dependem da obtenção das sequências dos genes ainda muito escassas para peixes nativos.

Os receptores utilizados, triploides de (*A. altiparanae*) e/ou híbridos triploides (*A. altiparanae* X *A. fasciatus*) também devem ser avaliados em relação a função e manutenção genes PGC-específicos, conferindo se estão fornecendo suporte necessários para apoiar e direcionar as PGCs doadas. Como também,

avaliar a eficiência do transplante utilizando receptores estéreis obtidos por outras metodologias, tal como pela injeção de morfolinós.

Desta forma, este estudo fornece subsídios para adaptações dos procedimentos de micromanipulação e transplante de PGCs, visando o aumento da eficiência desta técnica em espécies de peixes nativos da região neotropical. As adequações dos procedimentos da tecnologia de micromanipulação na geração de quimeras germinativas são desafios a serem alcançados para a aplicação desta biotécnica na conservação de espécies nativas ameaçadas. Em suma, neste trabalho foram obtidos dados importantes acerca da marcação, manutenção e migração direcional de PGCs. Embora promissores e inéditos para a literatura, ainda são necessários esforços em pesquisa a respeito de micromanipulação, cultivo, embriogênese e mecanismos moleculares da especificação e migração de PGCs, até a consolidação de quimeras germinativas para utilização na conservação e aquicultura.