

**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
<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
<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
<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
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	124
<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**

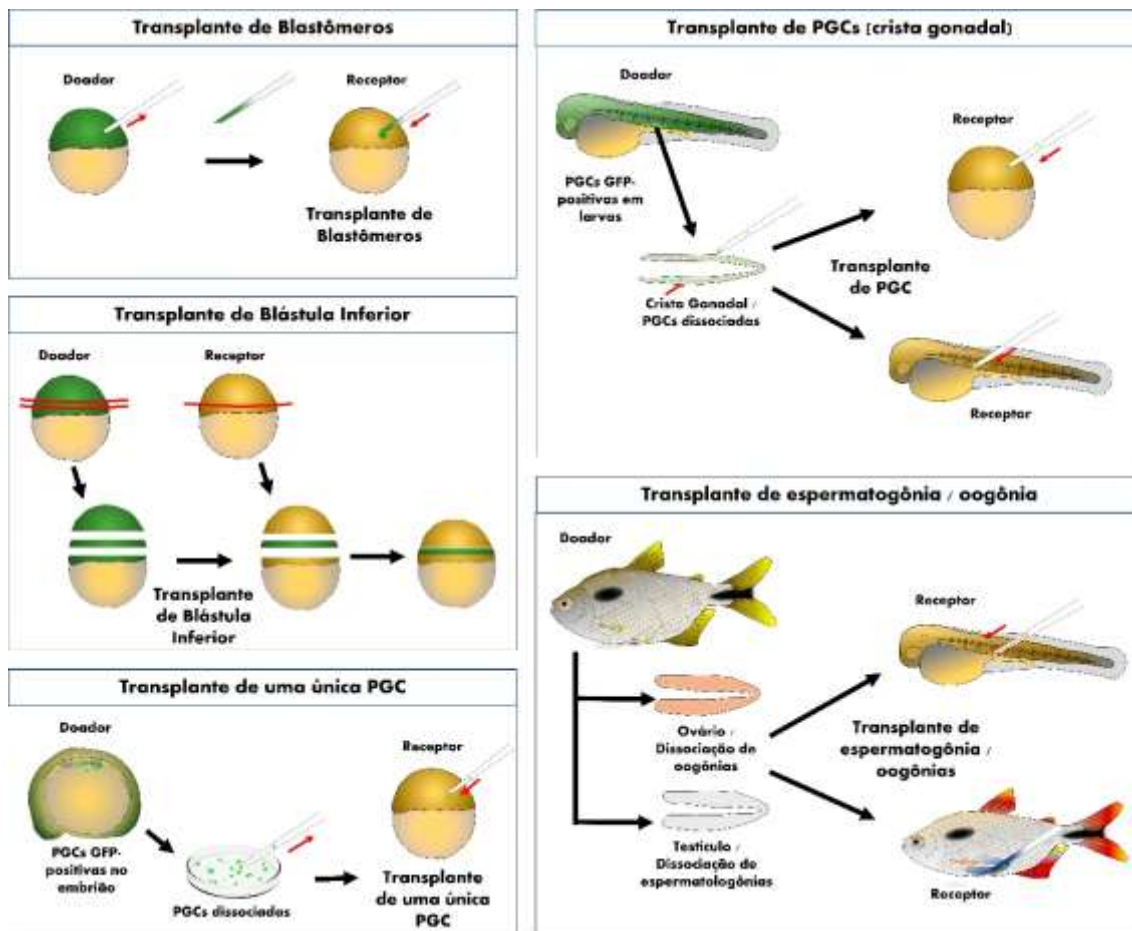
O conceito de quimerismo foi introduzido pela mitologia grega fazendo menções a criaturas composta por partes de vários animais. Atualmente, este termo é utilizado para se referir a indivíduos que apresentam coexistência de células provindas de zigotos diferentes (ROSSANT et al., 1982). Em quimeras somáticas, 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).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Implementar o transplante de PGCs entre Characiformes, visando futura construção de banco genético e subsequente reconstituição de espécies de peixes neotropicais, empregando o estudo de caracterização de PGCs para produção de quimeras germinativas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar e rastrear a migração de células germinativas primordiais (PGCs) *in vivo* de *Prochilodus lineatus* e *Piaratus mesopotamicus*, utilizando a tecnologia de microinjeção de mRNA marcador de PGCs, através da fusão da região codificante do gene *GFP* fusionado a região reguladora 3' UTR do gene *nanos1* (Capítulo I);
- Estabelecer procedimentos experimentais para obtenção de quimeras germinativas utilizando células germinativas primordiais (PGCs) em espécies neotropicais (Capítulo II);
- Avaliar a expressão gênica de diferentes genes relacionados ao desenvolvimento, manutenção e migração de células germinativas primordiais (PGCs) (Capítulo III).

### 3. ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA TESE

Diante dos os objetivos acima, esta tese foi dividida em três capítulos:

No capítulo I foi realizada a marcação de PGCs e a descrição de suas rotas de migração, utilizando a técnica de microinjeção de mRNA, constituído pela fusão da região reguladora de tradução 3'UTR do mRNA de *nanos1* de *Danio rerio* com a região codificante da GFP, em duas espécies neotropicais de grande valor econômico na aquicultura, *P. lineatus* e *P. mesopotamicus*. A região reguladora 3'UTR do mRNA de *nanos1* de *D. rerio* demonstrou ser um marcador específico para linhagem germinativa de ambas espécies estudadas. As informações apresentadas neste capítulo são bases para o desenvolvimento de biotecnologias envolvendo micromanipulação, como o transplante de PGCs, para constituição de quimeras germinativas.

No capítulo II foi realizado o transplante de PGCs de *A. altiparanae* e *P. lineatus*, cultivadas em solução salina e meio de cultivo celular suplementado, para receptores triploides (*A. altiparanae*) e/ou híbridos triploides (*A. altiparanae* X *A. fasciatus*). Devido as dificuldades de execução da técnica de transplante, a baixa eficiência e a necessidade de adaptações técnicas para o estabelecimento dos procedimentos em espécies neotropicais, inicialmente foi optada a utilização da espécie *A. altiparanae* como modelo de estudo. Principalmente pelos resultados prévios obtidos com esta espécie, como a marcação e rota de migração das PGCs já estabelecidas (dados não publicados). Além disso, *A. altiparanae* é uma espécie de fácil manuseio e criação em aquário, atinge a idade sexualmente madura com cerca de 4 meses, capaz de se reproduzir de 3 a 4 vezes ao ano, protocolo de reprodução *in vitro* bem estabelecido e boa

aclimatação as condições de sistema de micromanipulação. Apenas no transplante com PGCs cultivadas em meio de cultivo suplementado foi observada a migração direcionada para região da crista gonadal, sendo de 4,5% em receptores triploides e 19,3% em receptores híbridos triploides. Posteriormente, utilizamos a espécie *P. lineaus* como doador de PGCs. As informações iniciais necessárias para a realização do transplante foram obtidas no capítulo I. Os transplantes foram realizados utilizando apenas o receptor híbrido triploide, devido ao maior número de repetições realizadas com este receptor e conseqüentemente, os dados de uso deste receptor eram mais consolidados. Entretanto, foi verificada apenas a migração ectópica das PGCs de *P. lineaus* nos receptores avaliados.

No capítulo III foi realizada a análise do nível de expressão de diferentes genes relacionados ao desenvolvimento, manutenção e migração de PGCs, oriundas do cultivo em solução salina e meio de cultivo celular suplementado. Após os resultados obtidos no capítulo II, no qual foi alcançada a migração direcionada de PGCs doadas para região da crista gonadal de receptores apenas com a utilização de células cultivadas em meio suplementado, avaliamos a expressão relativa de genes PGCs-específicos de células cultivadas nas diferentes condições. Os resultados da expressão gênica em PGCs isoladas representam um bom indicativo de que a suplementação do meio de cultivo proporcionou melhores condições para PGCs, além de confirmar que as células isoladas para transplantes eram mesmo células germinativas primordiais. Alguns genes, como *dnd1*, *ddx4* e *dazl*, foram mais expressos em PGCs cultivadas em meio de cultivo celular suplementado do que em solução salina, indicando a manutenção das características de PGCs no meio suplementado. A análise do

nível de expressão destes genes em PGCs isoladas diretamente de embriões pode fornecer base para a comparação da expressão gênica oriundas do cultivo em diferentes meios. Desta forma, este estudo pode fornecer 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.

## Referências

ADAMOV, N. S. de M.; NASCIMENTO, N. F. Do; MACIEL, E. C. S.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; CALADO, L. L.; EVANGELISTA, M. M.; NAKAGHI, L. S. O.; GUERRERO, A. H. M.; FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra , *Astyanax altiparanae* , Using Temperature Shock : Tools for Conservation and Aquaculture. **JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY** doi:, [s. l.], 2016.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **MEGADIVERSIDADE**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 70–78, 2005. Disponível em:  
<[http://www.conservacaointernacional.org.br/publicacoes/files/11\\_Agostinho\\_et\\_al.pdf](http://www.conservacaointernacional.org.br/publicacoes/files/11_Agostinho_et_al.pdf)>

ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. **Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos**. 1º ed. Palmas.

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O MANEJO DA REPRODUÇÃO NATURAL E ARTIFICIAL E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO DE PEIXES NO BRASIL (NATURAL. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v. 27, p. 166–172, 2003. Disponível em:  
<[http://www.researchgate.net/publication/237659067\\_O\\_MANEJO\\_DA\\_REPRODUO\\_NATURAL\\_E\\_ARTIFICIAL\\_E\\_SUA\\_IMPORTNCIA\\_NA\\_PRODUO\\_DE\\_PEIXES\\_NO\\_BRASIL\\_\(NATURAL\\_AND\\_ARTIFICIAL\\_BREEDING\\_MANAGEMENT\\_AND\\_ITS\\_IMPORTANCE\\_IN\\_FISH\\_PRODUCTION\\_IN\\_BRAZIL\\_\)](http://www.researchgate.net/publication/237659067_O_MANEJO_DA_REPRODUO_NATURAL_E_ARTIFICIAL_E_SUA_IMPORTNCIA_NA_PRODUO_DE_PEIXES_NO_BRASIL_(NATURAL_AND_ARTIFICIAL_BREEDING_MANAGEMENT_AND_ITS_IMPORTANCE_IN_FISH_PRODUCTION_IN_BRAZIL_))>

ANTONIO, R. R.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; BAILLY, D.; OKADA, E. K.; DIAS, J. H. P. Blockage of migration routes by dam construction : can migratory fish find alternative routes ? **Neotropical Ichthyology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 177–184, 2007.

ARASHIRO, D. R.; YASUI, G. S.; CALADO, L. L.; PEREIRA-SANTOS, M.; LEVY-PEREIRA, N.; MONZANI, P. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SENHORINI, J. A. Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation. **Zygote**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 1–14, 2018.

ARAI, K. **Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan**. [s.l.] : Woodhead Publishing Limited, 2001. v. 197 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-50913-0.50013-8>>

ARAI, K.; FUJIMOTO, T. Genomic Constitution and Atypical Reproduction in Polyploid and Unisexual Lineages of the Misgurnus Loach , a Teleost Fish. **Cytogenetic and Genome Research**, [s. l.], v. 140, p. 226–240, 2013.

BERTOLINI, R. M.; SENHORINI, J. A.; NASCIMENTO, N. F. Do; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; PERES, W. A. M.; SILVA, R. C. Da; YASUI, G. S. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* : An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 49, p. 68–74, 2017.

BLASER, H.; REICHMAN-FRIED, M.; CASTANON, I.; DUMSTREI, K.; MARLOW, F. L.; KAWAKAMI, K.; SOLNICA-KREZEL, L.; HEISENBERG, C. Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells : A Role for Myosin Contraction and Cytoplasmic Flow. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 11, p. 613–627, 2006.

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>>

BRAAT, A. K.; SPEKSNIJDER, J. E.; ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. **International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 760, p. 745–760, 1999.

CAL, R. M.; VIDAL, S.; GÓMEZ, C.; ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; MARTÍNEZ, P.; PIFERRER, F. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot ( *Scophthalmus maximus* ). **Aquaculture**, [s. l.], v. 251, p. 99–108, 2006.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS ed. Porto Alegre. p. 65–70.

CIRUNA, B.; WEIDINGER, G.; KNAUT, H.; THISSE, B.; THISSE, C.; RAZ, E.; SCHIER, A. F. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. **Proc Natl Acad Sci**, [s. l.], v. 99, p. 14919– 14924, 2002.

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.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. [s. l.], p. 1–26, 2020.

FERNÁNDEZ, J. A.; BUBNER, E. J.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; WANG, T.; CUMMINS, S. F.; ELIZUR, A. Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 213, p. 16–23, 2015.

FLORENCE L. MARLOW; MULLINS, M. C. Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal- vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish Florence. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2009.

FRANĚK, R.; MARINOVIĆ, Z.; LUJIĆ, J.; URBÁNYI, B.; FUČÍKOVÁ, M.; KAŠPAR, V.; PŠENIČKA, M.; HORVÁTH, Á. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–17, 2019.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W.; VAN-DER-LAAN, R. **ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES**. 2020. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase. World Wide Web Electronic Publication**. 2015. Disponível em: <[www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)>.

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**, [s. l.], v. 23, p. 977–989, 2006.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. [s.l: s.n.]. v. 1

GOTO, R.; SAITO, T. A state-of-the-art review of surrogate propagation in fish. **Theriogenology**, [s. l.], v. 133, p. 216–227, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.032>>

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.semcdb.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>>

GÜRALP, H.; POCHERNIAIEVA, K.; BLECHA, M.; POLICAR, T.; PŠENIČKA, M.; SAITO, T. Migration of Primordial Germ Cells During Late Embryogenesis of Pikeperch Sander lucioperca Relative to Blastomere Transplantation. **J. Anim. Sci.**, [s. l.], v. 2017, n. 125, p. 121–129, 2017.

HAYASHI, C.; MEURER, F.; BOSCOLO, W. R.; LACERDA, C. H. F.; KAVATA, L. C. B. Freqüência de Arraçamento para Alevinos de Lambari do Rabo-Amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 21–26, 2004.

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.

HIGAKI, S.; ETO, Y.; KAWAKAMI, Y.; YAMAHA, E.; KAGAWA, N.; KUWAYAMA, M.; NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. **reproduction**, [s. l.], v. 139, p. 733–740, 2010.

HIGAKI, S.; TODO, T.; TESHIMA, R.; TOOYAMA, I.; FUJIOKA, Y.; SAKAI, N.; TAKADA, T. Cryopreservation of male and female gonial cells by vitrification in the critically endangered cyprinid honmoroko *Gnathopogon caerulescens*. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 503–513, 2018.

IBGE. Produção pecuária municipal 2016. **Instituto Brasileiro de geografia e estatística**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 1–51, 2016. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2016\\_v44\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf)>

ICMBIO/MMA. Volume VI -Peixes. In: ICMBIO (Ed.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: v. 7p. 1232.

ITAUSSÚ, D. R.; PORTO, S. M. de A.; CAVERO, B. A. S.; FONSECA, F. A. L. Da. Cultivo de Curimatã (*Prochilodus spp.*). In: BALDISSEROTTO, B. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil: 3ª edição revista, atualizada e amplificada**. 3. ed. [s.l.] : Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência - UFSM, 2020. p. 532.

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>>

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.

KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Generation of Viable Fish From Cryopreserved Primordial Germ Cells. **MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT**, [s. l.], v. 74, p. 207–213, 2007.

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.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; COSTA, G. M. J.; SEGATELLI, T. M.; QUIRINO, B. R.; QUEIROZ, B. M.; KALAPOTHAKIS, E.; FRANÇA, L. R. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish : The Nile Tilapia ( *Oreochromis niloticus* ) Model. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 1–9, 2010.

LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; SILVA, S. B. G.; HOMEM, C. S. P.; FRANÇA, L. R. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Animal Reproduction**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 145–159, 2006.

LEE, S.; YOSHIZAKI, G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). **Cryobiology**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 165–168, 2016.

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.

LIN, S.; LONG, W.; CHEN, J.; HOPKINS, N. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 89, n. 10, p. 4519–4523, 1992. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.10.4519>>

LINHARTOVA, Z.; SAITO, T.; PSENICKA, M. Embryogenesis, visualization and migration of primordial germ cells in tench (*Tinca tinca*). **Journal of Applied Ichthyology**, [s. l.], v. 30, n. S1, p. 29–39, 2014.

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 (Parana, Southern Brazil). **Archiv fur Hydrobiologie**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 285–306, 2000.

LUCENA, C. A. S. D. E.; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, [s. l.], v. 4072, n. 1, p. 101–125, 2016.

MIRANDA, J. C. Ameaças aos peixes de riachos da Mata Atlântica. **Natureza on line**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 136–139, 2012.

MISHIMA, Y.; GIRALDEZ, A. J.; TAKEDA, Y.; FUJIWARA, T.; SAKAMOTO, H.; SCHIER, A. F.; INOUE, K. Report Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by Zebrafish miR-430. **Current Biology**, [s. l.], v. 16, p. 2135–2142, 2006.

NAGAI, T.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Histological Differentiation of Primordial Germ Cells in Zebrafish. **Zoological Science**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 215–223, 2001.

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**, [s. l.], p. 624–631, 2002.

NAKATANI, K. .; AGOSTINHO, A. A. .; BAUMGARTNER, G. .; BIALETZKI, A. .; SANCHES, P. V. .; MAKRARIS, M. C. .; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: Eduem.

NASCIMENTO, N. F. Do; SIQUEIRA-SILVA, D. H. De; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* ( Garutti & Britski ) in laboratory conditions. **Zygote**, [s. l.], p. 1–8, 2017. a.

NASCIMENTO, N. F.; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L. H.; MANZINI, B.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 471, n. March, p. 163–171, 2017. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.007>>

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. [s.l: s.n.].

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; DE AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 14, p. 217–229, 2006.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 651–659, 2006.

NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; DE FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 1–16, 2010.

OTANI, A.; OTANI, S.; MAEGAWA, S.; INOUE, K.; ARAI, K. The Germ Cell Lineage Identified by vas-mRNA during the Embryogenesis in Goldfish The Germ Cell Lineage Identified by vas -mRNA during the Embryogenesis in Goldfish. **Zoological Science**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 519–526, 2002.

PAKSA, A.; RAZ, E. Zebrafish germ cells: Motility and guided migration. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 36, p. 80–85, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2015.07.007>>

PAULA, D. A. J.; MACHADO, M. R. F.; MURGAS, L. D. S.; RABELO, D.; ZANGERÔNIMO, M. G.; NETO, R. V. R.; ANDRADE, E. S.; ANDRADE, E. A. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 835–844, 2014.

PEIXE BR. Anuário 2020 Peixe BR da Piscicultura. **Anuário 2020 Peixe BR**, [s. l.], p.

1–136, 2020. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>>

PEIXEBR, A. B. da P. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2018**. [s.l.: s.n.].

PEREIRA-SANTOS, M. P.; YASUI, G. S.; XAVIER, P. L. P.; DE MACEDO ADAMOV, N. S.; DO NASCIMENTO, N. F.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 795–807, 2016.

PIVA, L. H.; SIQUEIRA-SILVA, D. H. De; GOMES, C. A. G.; FUJIMOTO, T.; SAITO, T.; DRAGONE, L. V.; SENHORINI, J. A.; PORTO-FORESTI, F.; FERRAZ, J. B. S.; YASUI, G. S. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? **Theriogenology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.013>>

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSERTO, B.; GOMES, L. C. (Eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. [s.l.: s.n.]. p. 105–120.

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>>

PŠENIČKA, M.; SAITO, T.; LINHARTOVÁ, Z.; GAZO, I. Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. **Theriogenology**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 1085–1092, 2015.

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.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.

ROBLES, V.; RIESCO, M. F.; PŠENIČKA, M.; SAITO, T.; VALCARCE, D. G.; CABRITA, E.; HERRÁEZ, P. Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. **Aquaculture**, [s. l.], v. 472, p. 4–20, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.004>>

ROSSANT, J.; CROY, B. A.; CHAPMAN, V. M.; SIRACUSA, L.; CLARK, D. A. Interspecific chimeras in mammals: a new experimental system. **Journal of animal science**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 1241–1248, 1982.

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aqüicultura brasileira. In: FILHO, J. C. (Ed.). **Panorama da Aqüicultura**. 76. ed. [s.l.: s.n.]. p. 47–58.

SAITO, T.; FUJIMOTO, T.; MAEGAWA, S.; INOUE, K.; TANAKA, M.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. **International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 691–700, 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.

SAITO, T.; PSENICKA, M. Novel Technique for Visualizing Primordial Germ Cells in Sturgeons (*Acipenser ruthenus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. baerii*, and *Huso huso*)1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.115.128314>>

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.

SHINOMIYA, A.; TANAKA, M.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y.; HAMAGUCHI, S. The vasa-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. **Development Growth and Differentiation**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 317–326, 2000.

SIQUEIRA-SILVA, D. H. De; PEREIRA, A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Theriogenology The effects of temperature and busulfan ( Myleran ) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* ( Pisces , Characiformes ) spermatogenesis. **Theriogenology**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 1033–1042, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.004>>

SIQUEIRA-SILVA, D. H. De; SAITO, T.; SANTOS-SILVA, A. P.; COSTA, S.; PSENICKA, M.; YASUI, G. S. Biotechnology applied to fish reproduction : tools for conservation. **Fish Physiol Biochem**, [s. l.], p. 1–17, 2018.

SKUGOR, A.; TVEITEN, H.; KRASNOV, A. Knockdown of the germ cell factor *Dead end* induces multiple transcriptional changes in Atlantic cod ( *Gadus morhua* ) hatchlings. [s. l.], v. 144, p. 129–137, 2014.

TAKEUCHI, Y.; YATABE, T.; YOSHIKAWA, H.; INO, Y.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock. **Aquaculture**, [s. l.], v. 494, p. 45–56, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.030>>

TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Production of Germ-Line Chimeras in Rainbow Trout by Blastomere Transplantation. **Molecular reproduction and development**, [s. l.], v. 59, p. 380–389, 2001.

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.

TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUSHI, T. Surrogate broodstock produces salmonids. **Nature**, [s. l.], p. 629–630, 2004.

TOLUSSI, C. E.; GOMES, A. D. O.; KUMAR, A.; RIBEIRO, C. S.; NOSTRO, F. L. L.; BAIN, P. A.; DE SOUZA, G. B.; CUÑA, R. Da; HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 147, n. May 2017, p. 926–934, 2018.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Eds.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. [s.l: s.n.]. p. 205–244.

URBINATI, E. C.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil: 3º edição revista, atualizada e amplificada**. 3. ed. [s.l.] : Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência - UFSM, 2020. p. 532.

VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N. .; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAU, Z. A.; VERÍSSIMO-SIVEIRA, R. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga , *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 43, p. 546–555, 2012. a.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. . M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders , cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* ( Characiformes ). **Theriogenology**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 361–368, 2012. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.015>>

WAKAMATSU, Y.; HASHIMOTO, H.; KINOSHITA, M.; IWAMATSU, T.; HYODO-TAGUCHI, Y.; TOMITA, H.; SAKAGUCHI, M.; OZATO, K. Generation of germ-line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*). **Mol. Mar. Biol. Biotech.**, [s. l.], v. 2, p. 325–332, 1993.

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.

WONG, T.; SAITO, T.; CRODIAN, J.; COLLODI, P. Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae 1 Production of Sterile Danio Hybrid Larvae. [s. l.], v. 1197, n. January, p. 1190–1197, 2011.

XU, E. Y.; MOORE, F. L.; REIJO PERA, R. A. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 98, n. 13, p. 7414–7419, 2001.

XU, H.; LI, Z.; LI, M.; LI, W.; HONG, Y. Boule is present in fish and bisexually expressed in adult and embryonic germ cells of Medaka. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 6,

2009.

YAMAHA, E.; GOTO-KAZETO, R.; SAITO, T.; KAWAKAMI, Y.; FUJIMOTO, T.; ADACHI, S.; ARAI, K. Primordial germ cell in teleost fish with special references to its specification and migration. **Journal of Applied Ichthyology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 816–822, 2010.

YAMAHA, E.; KAZAMA-WAKABAYASHI, M.; OTANI, S.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. **Genetica**, [s. l.], v. 111, n. 1–3, p. 227–236, 2001.

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**, [s. l.], v. 119, n. 2, p. 121–131, 2003.

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.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage : an approach for biotechnology in laboratory fish. **The Animal Consortium**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 464–470, 2014.

YASUI, G. S.; PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B. De; SENHORINI, J. A.; NASCIMENTO, N. P. Do; FORESTI, F. Biologia e criação do Lambari-do-Rabo-Amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil: 3ª edição revista, atualizada e amplificada**. 3. ed. [s.l.] : Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência - UFSM, 2020. p. 532.

YÖN, N. D.; AKBULUT, C. Identification of primordial germ cells: Cytological, histological and immunohistochemical aspects. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 222–228, 2015.

YOON, C.; KAWAKAMI, K.; HOPKINS, N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 124, n. 16, p. 3157–65, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9272956>>

YOSHIKAWA, H.; XU, D.; INO, Y.; YOSHINO, T.; HAYASHIDA, T.; WANG, J.; YAZAWA, R.; YOSHIKAWA, G.; TAKEUCHI, Y. Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells. **Genetics**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 507–521, 2018.

YOSHIKAWA, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. **Development**, [s. l.], v. 137, n. 8, p. 1227–1230, 2010.

YOSHIKAWA, G.; SAKATANI, S.; TOMINAGA, H.; TAKEUCHI, T. Cloning and Characterization of a vasa -Like Gene in Rainbow Trout and Its Expression in the

Germ. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 371, n. July 1999, p. 364–371, 2000.

YOSHIZAKI, G.; TAGO, Y.; TAKEUCHI, Y.; SAWATARI, E.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, T. Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae.

**Biology of reproduction**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 88–93, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.104.034249>>

YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, Y.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, T. Primordial germ cell: A novel tool for fish bioengineering. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 28, n. 1–4, p. 453–457, 2003.

## 4. CAPÍTULO I: RASTREAMENTO DE CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS

Os dados referentes a este capítulo foram a base para a publicação dos artigos abaixo:

Coelho, G C Z; Arashiro, D R; Disselli, T; Pereira-Santos, M; Mira-López, T M; Monzani, P S; Senhorini, J A; Fujimoto, T; Yasui, G S. Developmental stages, incubation temperature, and in vivo traceability of primordial germ cell in an important aquaculture species *Piaractus mesopotamicus*. AQUACULTURE, v. 535, p. 736381, 2021. (Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736381)

Coelho, G C Z; Yo, I S; Mira-López, T M; Monzani, P S; Arashiro, D R; Fujimoto, T; Senhorini, J A; Yasui, G S. Preparation of a fish embryo for micromanipulation: staging of development, removal of the chorion and traceability of PGCs in *Prochilodus lineatus*. INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, v. 63, p. 57-65, 2019. (Doi: 10.1387/ijdb.180348gc)

### Resumo

A técnica de transplante de células germinativas primordiais é considerada uma abordagem promissora para a reconstituição de espécies ameaçadas de extinção e no aperfeiçoamento zootécnico para produção aquícola. O uso de espécies modelos pode auxiliar a compreensão e padronização de técnicas avançadas como a micromanipulação do embrião e de células germinativas, para posterior implementação em espécies ameaçadas de extinção. Assim, este estudo teve como objetivo identificar e rastrear a migração de células germinativas primordiais (PGCs) *in vivo* de *Prochilodus lineatus* e *Piaratus mesopotamicus*, utilizando a tecnologia de microinjeção de mRNA marcador de PGCs, através da fusão da região codificante do gene *gfp* fusionado a região reguladora 3' UTR do gene *nanos1* proveniente do zebrafish. Os resultados provenientes deste estudo são bases para futura aplicação de biotecnologias reprodutivas objetivando a reconstituição de espécies, por meio da produção de quimeras germinativas. As primeiras PGCs GFP-positivas foram visualizadas no início do estágio de segmentação, quando os embriões apresentavam em média 6 somitos, em ambas as espécies. O número de células positivas para GFP variou de 8 a 20 por embrião (13,8; n=5) para *P. lineatus* e de 7 a 18 por embrião (média 11,2; n = 5) para *P. mesopotamicus*. Após eclosão em *P. lineatus*, o número de células positivas variou de 14 a 27 por embrião (média de 19,8; n = 5), sendo possível visualizar células GFP-positivas até o 10º dia pós eclosão. Enquanto que em *P. mesopotamicus*, o número de PGCs observado após eclosão variou de 7 a 22 por embrião (média de 14,6; n=5), sendo visualizadas até o 9º dia pós eclosão. Neste estágio, as células estavam posicionadas na

região de extensão do vitelo. Estes são os primeiros relatos sobre a visualização de PGC *in vivo* em peixes neotropicais; os dados obtidos fornecem informações sobre a identificação e migração de PGCs. As informações apresentadas neste trabalho trazem novos insights sobre a construção de banco genético em espécies neotropicais e sua posterior reconstituição por meio de uma quimera germinativa.

#### **4.1. Material e Métodos**

Os exemplares das espécies *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus* foram obtidas junto ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (ICMBio/CEPTA), em Pirassununga–SP. Os procedimentos e análises experimentais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Peixe do mesmo Centro, em consonância com o comitê de ética para o uso de animais de laboratório do CEPTA/ICMBio (CEUA/CEPTA n° 02031.000033/2015-11).

##### **4.1.1. Procedimento geral de fertilização e obtenção de embriões**

Três casais de ambas espécies foram selecionados para reprodução artificial com base em suas características externas e comportamento. Os machos foram selecionados com base na liberação seminal, após leve massagem abdominal e sons reprodutivos. As fêmeas foram selecionadas com base na coloração avermelhada na área da papila urogenital e volume abdominal. As desovas foram realizadas por indução hormonal com macerado de hipófise desidratada de carpa comum, diluído em solução fisiológica (NaCl a

0,9%) e injetado intraperitonealmente. Após serem anestesiados com óleo de cravo-da-índia (100 mg. L<sup>-1</sup>), Biodinâmica, Hortolândia, Brasil), as fêmeas de *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* foram induzidas a ovulação com duas doses, sendo a primeira de (0,5 mg.kg<sup>-1</sup>) e segunda de (5,0 mg.kg<sup>-1</sup>) com cerca de 8 a 10 horas após a primeira dose. Os machos foram induzidos a espermição com dose única, juntamente com a segunda dose da fêmea e na mesma proporção hormonal. Após a injeção, os peixes foram mantidos em tanques de 8000 L com fluxo constante e temperatura entre 27°C e 30°C (ARASHIRO et al., 2018; PEREIRA-SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2017). Um casal de reprodutores foi utilizado para cada repetição do estudo e os dados avaliados são uma média das três repetições.

A predição da maturação de gametas foi realizada pela metodologia hora-graus, que é realizada somando a temperatura da água (°C) de cada hora até a desova, resultando entre 180 a 230 hora-graus para as espécies em estudo. Os peixes foram anestesiados conforme mencionado anteriormente e os oócitos foram coletados por extrusão em recipiente plástico, e o esperma foi distribuído na região central do recipiente. Os gametas foram ativados pela adição de água e rapidamente homogeneizados manualmente. Após a fertilização, uma alíquota de ovos foi imediatamente utilizada para etapa de microinjeção de mRNA.

#### **4.1.2. Síntese de GFP-nanos1 3'-UTR mRNA**

O GFP-*nos1* 3'UTR mRNA foi produzido usando como modelo o vetor pCS2-GFP-*nanos1* 3'UTR, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Takafumi Fujimoto

(Universidade de Hokkaido, Japão), que contém a região 3'UTR do gene *nanos1* de *Danio rerio* (Kopranner et al., 2001) em fusão com a região codificante para proteína verde fluorescente (GFP). O vetor foi clivado com a enzima de restrição Not I (IVGN0014, Anza™, Invitrogen™) e o mRNA foi sintetizado *in vitro* utilizando um kit comercial mMMESSAGE MACHINE Kit® (AM 1340, Ambion®, Life Technologies™). O mRNA transcrito foi precipitado por LiCl e suspenso em 200 mM de KCl na concentração final de 100 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ . A concentração e qualidade do mRNA foi medida no espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen, Hilden, Alemanha).

#### **4.1.3. Microinjeção de mRNA, identificação e rastreamento de células germinativas primordiais**

Uma alíquota de ovos (~200) recém fertilizados foi utilizada para remoção enzimática de corion e microinjeção de mRNA. Para remoção do córion, os zigotos foram distribuídos em placa de Petri (100 x 20 mm) contendo a solução salina Characin (12 mM NaCl, 1 mM KCl, 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$  e 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ), acrescida com 0,05% de pronase (Sigma # SLMQ2345V, St. Louis, USA). Esta solução foi previamente testada em estudos anteriores, sendo obtidas as melhores taxas de eclosão e normalidade em embriões e larvas de curimba e pacu. As placas foram agitadas em movimentos circulares constantemente, de forma a facilitar a ação da enzima, sendo a remoção do córion observada em esteromicroscópio (SMZ18, Nikon®, Tóquio, Japão) até atingir cerca de 80% de remoção, e seguido da transferência dos zigotos para placas de Petri revestidas

com ágar 1%, para proteção mecânica dos embriões, preparadas em solução de Characin.

Aproximadamente 10 nL da solução de mRNA (*GFP-nanos1* 3'UTR) foram microinjetadas em blastodiscos de ovos decorionados, no estágio de uma célula, para a identificação e acompanhamento da rota de migração das PGCs. A quantidade de ovos utilizados para o procedimento de microinjeção variou a cada repetição, de acordo com o tempo gasto entre fertilização, remoção de corion e injeção de mRNA, sendo influenciado pela qualidade da desova, velocidade do desenvolvimento e temperatura. Em geral, foram microinjetados cerca de 100 a 150 embriões, após a remoção do córion. A microinjeção foi realizada utilizando micropipeta de boro-silicato com 10 µm de diâmetro (Drummond, Eugene, EUA) conectada a um microinjetor (CellTram vario, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), acoplado ao micromanipulador (M-152, Narishige, Tóquio, Japão) e efetuada sob esteriomicroscópio (SMZ18, Nikon®, Tóquio, Japão).

Os desenvolvimentos embrionários e larvais foram avaliados sob estereomicroscopia de fluorescência (Nikon SMZ18, Tóquio, Japão), e uso de câmera CCD (DS-Ri2, Nikon, Toquio, Japão). Imagens digitais foram capturadas usando o Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão). Foram analisados os parâmetros de taxa de fertilização (no estágio de duas células), clivagem, blástula, gástrula, segmentação e porcentagens de larvas normais e anormais, tais como a presença de malformação cefálica, notocorda, vitelo, tronco e cauda (ARASHIRO et al., 2018; FUJIMOTO et al., 2006; PEREIRA-SANTOS et al., 2016),

Os ovos microinjetados e grupos controles (com córion e sem córion, ambos não injetados) foram mantidos em placas de Petri 150 x 25 com 200 mL de solução de Characin, acrescido de 0.01% penicilina e 0.01% estreptomicina. Foram realizadas trocas de solução a cada 30 a 60 minutos. Os embriões foram mantidos em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) na temperatura de 26°C. Após a eclosão, as larvas foram mantidas em placas de Petri de 150 x 25 a 26°C com constantes mudanças de água. O acompanhamento das PGCs foi realizado desde o início da expressão de GFP até o seu completo desaparecimento por meio de observações em estereomicroscopia de fluorescência (Nikon SMZ18, Tóquio, Japão) (Excitation wavelength 470/40 nm). A quantidade de células GFP-positivas foi analisada utilizando cerca de 5 embriões, em média, por repetição.

#### **4.1.4. Estatística**

Os dados foram avaliados como média  $\pm$  erro padrão da média. Todos os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Lilliefors e, em seguida, submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As médias foram comparadas por meio do teste não paramétrico de amplitude múltipla de Tukey, por meio do software Statistics 10.0. A probabilidade de 0,05 foi estabelecida para todas as análises.

## 4.2. Resultados

A marcação de PGCs pela expressão de GFP em *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus* foi obtida com sucesso, permitindo a identificação e subsequente rastreamento da rota migratória até a fase larval (Fig. 1, 2 e 3). No total, foram microinjetados 142 ovos de *P. lineatus* e 107 de *P. mesopotamicus*, nos quais 106 (74,64%) e 69 (64,48%), respectivamente, apresentaram células GFP-positivas *in vivo* quando observadas em estereomicroscópio de fluorescência. Não foi observada diferença significativa na análise do desenvolvimento embrionário, quanto a sobrevivência e porcentagem de larvas normais, para os grupos experimentais: os injetados com mRNA (GFP-*nanos1* 3'UTR) e grupos controles com e sem córion (Tabela 1 e 2). Todos os grupos apresentaram mais de 50% de eclosão, apresentando mais de 90% de embriões normais.

As primeiras observações de PGCs foram obtidas no início do estágio de segmentação, quando os embriões apresentaram em média 6 somitos em ambas as espécies, com aproximadamente 9 horas pós fertilização para *P. lineatus* e 11 horas pós fertilização para *P. mesopotamicus*. O número de células GFP-positivas variou de 8 a 20 por embrião (média 13,8; n = 5) em *P. lineatus* e de 7 a 18 por embrião (média 11,2; n = 5) em *P. mesopotamicus*. Nesta fase, a localização das PGCs variou entre as espécies. Em *P. lineatus*, as PGCs estavam localizadas entre o primeiro e sexto somito, já em *P. mesopotamicus* as PGCs na maioria dos embriões foram encontradas em toda extensão dos somitos. Para ambas espécies, as PGCs foram observadas em ambos os lados do eixo dorsal. Nos estágios de desenvolvimento anteriores não foi possível

identificar as PGCs devido à fluorescência intensa em todas os outros tipos celulares (Fig. 1).

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

	n	Não fertilizado	Clivagem	Blástula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
<b>Controle com corion</b>	150	0.7 ± 0.0%	99.3 ± 0.6%	86.0 ± 5.9%	79.3% ± 8.1%	68.7 ± 12.1%	67.3 ± 12.6%	94.8 ± 2.9 %	5.2 ± 2.9%
<b>Controle sem corion</b>	150	6.1 ± 0.0%	93.9 ± 4.2%	82.0 ± 1.9%	78.0 ± 3.4%	58.7 ± 2.2%	58.8 ± 2.5%	93.1 ± 0.3%	6.9 ± 0.3%
<b>Microinjetado</b>	142	4.6 ± 0.0%	95.4 ± 0.9%	83.7 ± 2.3%	76.7 ± 3.0%	57.4 ± 4.1% 107*	56.2 ± 4.9%	91.7 ± 1.4%	8.3 ± 1.4%

Não houve diferença significativa entre os grupos controles e grupo experimental em cada estágio de desenvolvimento. (P> 0,05).

\*Embriões com células positivas para GFP.

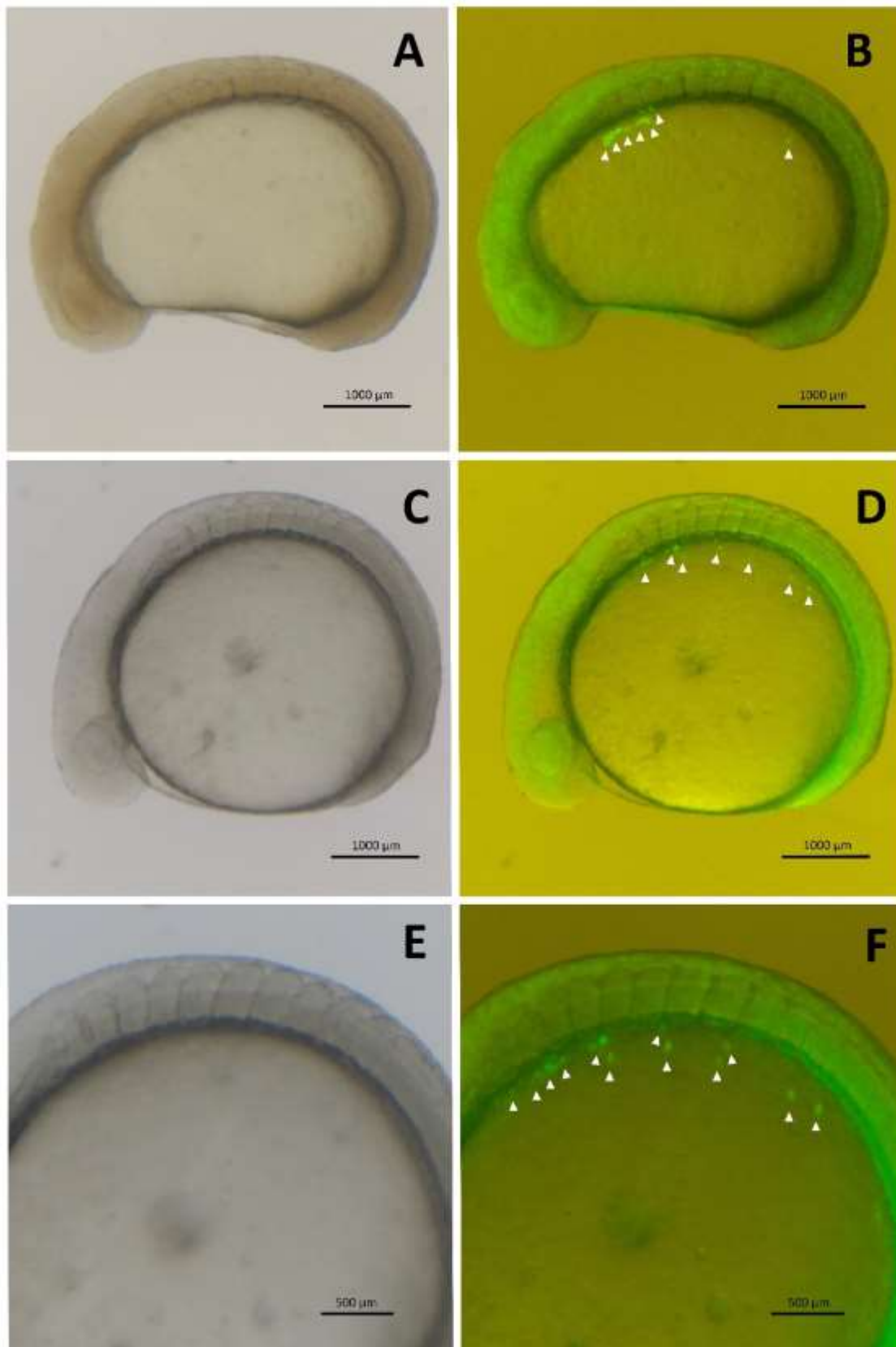
**Tabela 2:** Sobrevivência de embriões e de larvas normais e anormais de *Piaractus mesopotamicus* durante o desenvolvimento embrionário, nos diferentes grupos experimentais.

	n	Não fertilizado	Clivagem	Blástula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
<b>Controle com corion</b>	133	5.1 ± 0.0%	94.9 ± 2.5%	76.7 ± 2.7%	70.0 ± 2.8%	63.3 ± 5.4%	52.0 ± 6.2%	96.0 ± 0.5 %	4.0 ± 0.5%
<b>Controle sem corion</b>	95	6.5 ± 0.0%	93.5 ± 2.1%	76.0 ± 1.6%	66.7 ± 2.7%	58.7 ± 4.7%	50.0 ± 4.7%	91.9 ± 3.2%	6.8 ± 2.2%
<b>Microinjetados</b>	107	4.6 ± 0.0%	95.4 ± 1.5%	74.1 ± 1.6%	65.1 ± 3.6%	59.6 ± 4.6% 69*	49.4 ± 5.9%	93.4 ± 2.7%	6.6 ± 2.7%

Não houve diferença significativa entre os grupos controles e grupo experimental em cada estágio de desenvolvimento. (P> 0,05).

\*Embriões com células positivas para GFP

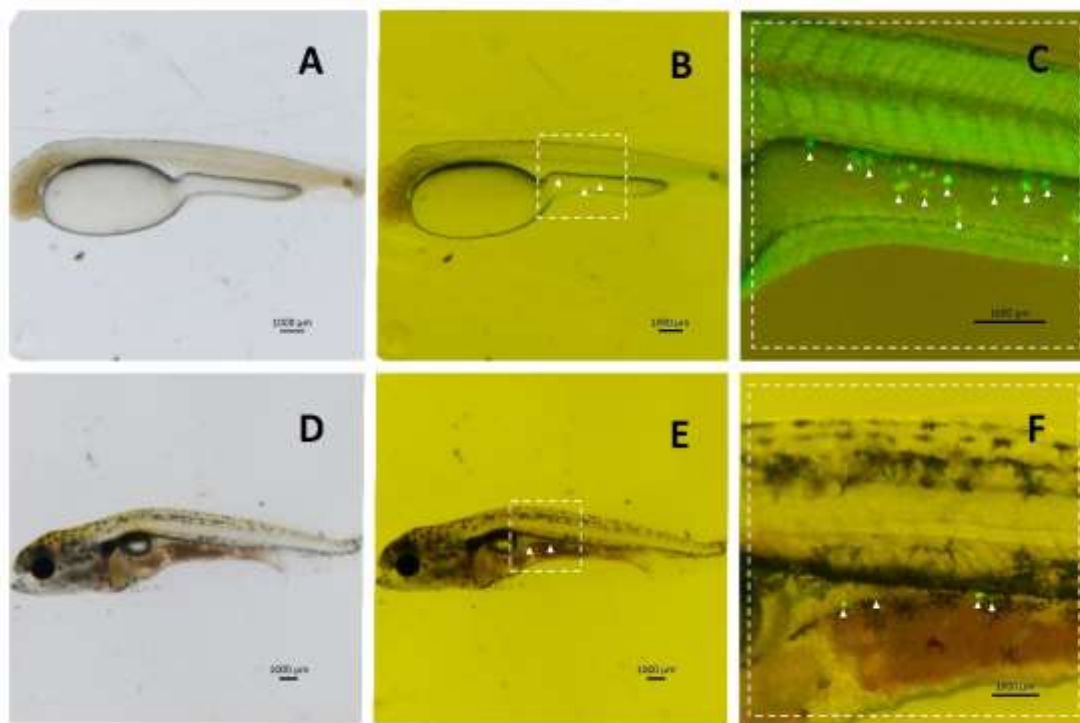
**Figura 1:** Visualização *in vivo* de células germinativas primordiais (PGCs) em estágio de segmentação em embriões injetados com mRNA (GFP-*nanos1* 3'UTR). A e B - Embrião de *Prochilodus lineatus* com 11 somitos (PGCs, ponta da seta). C e D - Embrião de *Piaractus mesopotamicus* com 10 somitos (PGCs,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



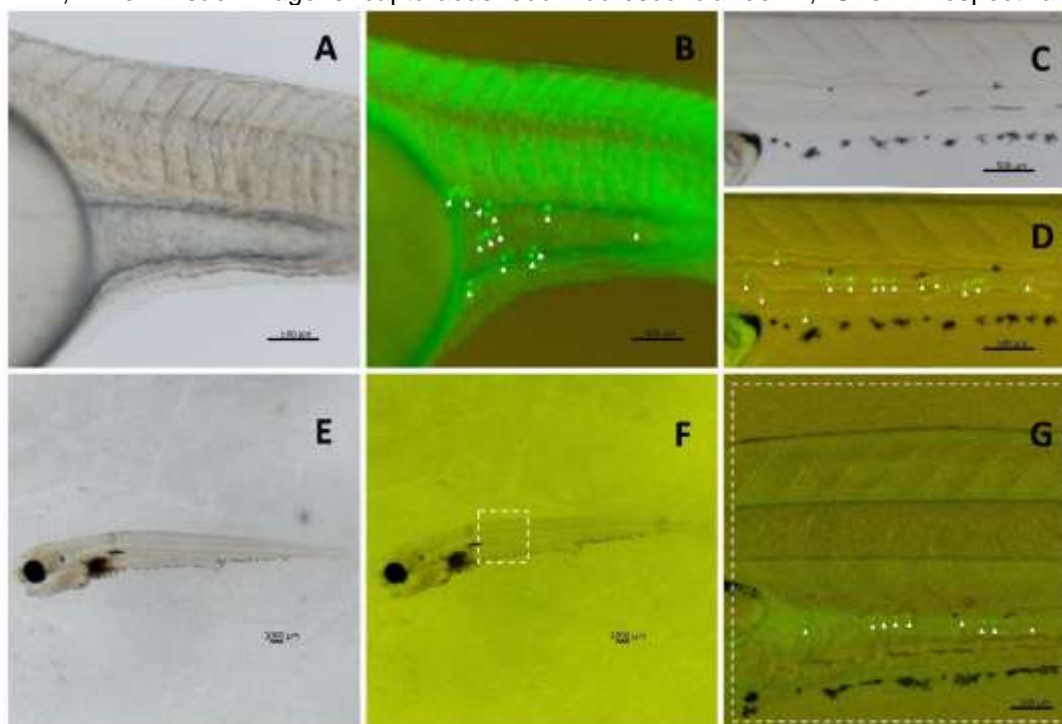
Após a eclosão, as células GFP-positivas migraram para a região de extensão do vitelo. Em *P. lineatus* variou de 14 a 27 por embrião (média 19,8; n = 5) (Fig. 2 A–C), o rastreamento aconteceu até o décimo dia pós-eclosão (Fig. 2 D–F e 4 A), o número de células GFP-positivas foram diminuindo gradativamente. Para *P. mesopotamicus* as PGCs variaram de 7 a 22 por embrião (média 14,6; n = 5) (Fig 3 A-B), e o rastreamento foi até o nono dia pós-eclosão (Fig. 3 e 4 B). Durante esse período não foi observada alterações na posição das células GFP-positivas.

Em *P. lineatus*, no primeiro dia pós-eclosão, foram encontradas 9 a 19 (média 12,8; n = 5) PGCs por larva, no quinto dia, foram observadas de 6 a 16 (média 10,6; n = 5), enquanto no décimo dia havia entre 4 a 5 (média 4,5; n = 5) por larva (Fig. 2 e 4 A). Em *P. mesopotamicus*, no primeiro dia pós-eclosão, foram observadas 7 a 18 PGCs por larva (média 12,8; n = 5), no terceiro e quarto dia de 10 a 46 (média 29,2; n = 5) (Fig. 3 C–D). Após este período, o número de células GFP-positivas foram diminuindo gradativamente, no sétimo dia pós-eclosão foi de 4 a 19 (média 10,6; n = 5) (Fig.3 E-G), chegando no nono dia com 4 a 7 (média 5,7; n=5) GFP-positivas por larva (Fig. 3 e 4 B).

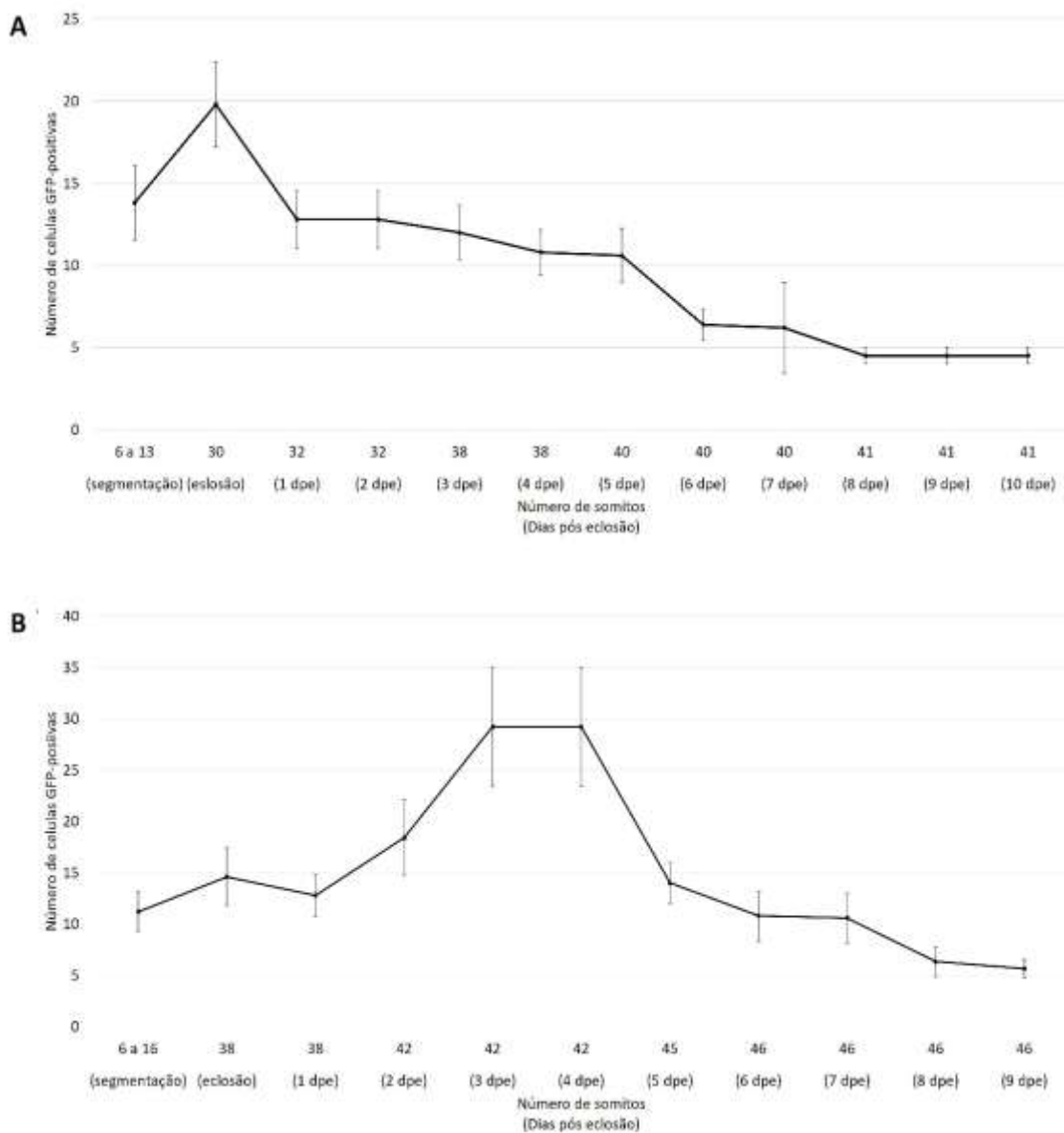
**Figura 2:** Visualização *in vivo* de células germinativas primordiais (PGCs) em larvas de *Prochilodus lineatus* injetadas com mRNA de GFP-*nanos1* 3'UTR. **A e B** - Larva recém-eclodida (PGCs, ponta de seta). **C** - Detalhe da região destacada em **B**. **D e E** - Larva 10 dias após a eclosão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



**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.



**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 10º dia após a eclosão. **B** - PGCs evidenciadas em *Piaractus mesopotamicus* durante o estágio de segmentação até o 9º dia após a eclosão. Embriões e larvas foram incubados a 26°C.



### 4.3. Discussão

A identificação e rastreamento de células germinativas primordiais de peixes foram realizadas utilizando procedimentos *in vitro*, incluindo observações histológicas e a expressão de gene *ddx4* e *nanos* em embriões fixados pela metodologia de WISH e ISH (BLASER et al., 2006; BRAAT; SPEKSNIJDER; ZIVKOVIC, 1999; FERNÁNDEZ et al., 2015; OTANI et al., 2002; YOON; KAWAKAMI; HOPKINS, 1997). Entretanto, tais técnicas utilizam células fixadas, perdendo a capacidade para transplante, enquanto que procedimentos de injeção de mRNA artificial, construído pela combinação de uma sequência de proteína fluorescente verde (GFP) com a região reguladora de tradução 3'UTR do gene *nanos1* de *D. rerio*, permite a marcação de células germinativas primordiais *in vivo*. Esta técnica possibilita o estudo *in vivo* dos mecanismos de migração e contribuí para o estabelecimento de procedimentos de micromanipulação a serem utilizados no isolamento, criopreservação e transplante de células (FUJIMOTO et al., 2006; GÜRALP et al., 2017; HIGAKI et al., 2010; KAWAKAMI et al., 2010; LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014; YASUI et al., 2011). Estes procedimentos possibilitam a construção de bancos genéticos para espécies ameaçadas de extinção, principalmente pela geração de quimeras germinativas.

A marcação das PGCs e a definição de sua rota de migração em *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* foram possíveis pela injeção de mRNA contendo a fusão da região reguladora de tradução 3'UTR do gene *nanos1* 3'UTR de *Danio rerio* com a região codificante da GFP. A região reguladora 3'UTR de *nanos1* de

*D. rerio* demonstrou ser um marcador específico para linhagem germinativa para ambas espécies estudadas.

A visualização de PGCs usando a região reguladora 3'UTR de *nanos1* de *D. rerio* foi de 69,3% dos embriões injetados de *Tinca tinca* (LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014), 100% em *Leucopsarion petersii*, 97,7% em *Oryzias latipes*, 100% em *Carassius auratus*, 100% em *Danio rerio*, 98,5% *Danio albolineatus*, 100% *Clupea pallasii*, 99,5% *Misgurnus anguillicaudatus* (SAITO et al., 2006), 59,3% *Anguilla japonica* (SAITO et al., 2011). Em nosso estudo observamos a presença de PGCs positivas para GFP em 74,64% dos embriões injetados de *P. lineatus* e em 64,48% dos embriões de *P. mesopotamicus*, sugerindo a conservação deste mecanismo de regulação da região 3'UTR de *nanos* entre espécies mais distantes, atuando em processos importantes de manutenção e diferenciação de PGC.

A visualização das primeiras PGCs em *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* ocorreu no início do estágio de segmentação. Nos estágios anteriores de desenvolvimento, a expressão GFP em células somáticas embrionárias ainda era notável, impossibilitando a identificação dos PGCs. Durante o desenvolvimento, a fluorescência nas células somáticas diminuiu, tornando-se menos evidente. De acordo com Mishima et al., (2006), a porção 3'UTR *nanos1* é degradada em células somáticas durante todo o desenvolvimento embrionário, mas permanece estável nas células germinativas. Utilizando a mesma metodologia, nos estudos realizado por Fernández et al., (2015), Linhartova et al., (2014), Saito et al., (2006, 2011) e Guralp et al., (2017) as PGCs positivas para GFP tornaram-se evidentes nos estágios finais de gastrulação. Para espécies neotropicais como *Pimelodus maculatus*, *Brycon amazonicus* as PGCs

foram visualizadas junto com os primeiros somitos e em *Astyanax altiparanae* na transição do estágio de gástrula para segmentação (dados não publicados).

As células germinativas primordiais são especificadas no início do desenvolvimento e migram do seu local de origem para o local onde serão formadas as gônadas, juntamente com as células somáticas (BARTON; LEBLANC; LEHMANN, 2016; GROSS-THEBING et al., 2017). As PGCs visualizadas em *P. lineatus* foram localizadas principalmente entre os primeiros somitos, e podem ser observadas próximo à junção do vitelo na eclosão. Semelhanças foram encontradas com a espécie *P. mesopotamicus*, no início da segmentação e as PGCs foram distribuídas por toda a extensão dos somitos, com maior número na região dos primeiros somitos, enquanto que na eclosão foi possível visualizar as PGCs agrupadas na junção do vitelo. Nas espécies *Tinca tinca* (LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014), *Sander lucioperca* (GÜRALP et al., 2017), *Clupea pallasii*, *Danio rerio*, *Danio albolineatus*, *Carassius auratus*, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Oryzias latepis* e *Leucopsarion petersii* (SAITO et al., 2006), foi demonstrado que as PGCs estão localizadas na região médio-posterior da extensão dos somitos, e após a eclosão, essas células de localizam na extensão do vitelo.

De acordo com Saito et al., (2006), as PGCs dos peixes apresentam variações no padrão de localização, distribuição ao longo dos lados do corpo, direção do movimento e posições finais, exigindo caracterização desses padrões para as espécies modelos em uso de biotecnologias envolvendo micromanipulação. As PGCs deslocam-se por movimentos morfogenéticos, sendo guiadas por mecanismo de atração e repulsão em direção a crista gonadal, exibindo comportamento ativo, que são caracterizadas pela formação

de saliências durante o processo de migração (BARTON; LEBLANC; LEHMANN, 2016; BLASER et al., 2006; GÜRALP et al., 2017).

Neste presente trabalho foi realizada a identificação e rastreamento da rota de migração de PGCs *in vivo* nas espécies *P. lineatus* e *P. mesopotamicus*, fornecendo informações importantes que permitirão o avanço na construção de bancos de genéticos para espécies neotropicais. As PGCs retêm a capacidade de se diferenciar em espermatozoides e oócitos, mantendo a variabilidade genética, sendo consideradas importantes para a construção de bancos genéticos e implementação de biotecnologias reprodutivas avançadas, como o quimerismo germinativo para reconstituição de espécies.

## Referências

- ARASHIRO, D. R.; YASUI, G. S.; CALADO, L. L.; PEREIRA-SANTOS, M.; LEVY-PEREIRA, N.; MONZANI, P. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SENHORINI, J. A. Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation. **Zygote**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 1–14, 2018.
- 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>>
- BLASER, H.; REICHMAN-FRIED, M.; CASTANON, I.; DUMSTREI, K.; MARLOW, F. L.; KAWAKAMI, K.; SOLNICA-KREZEL, L.; HEISENBERG, C. Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells : A Role for Myosin Contraction and Cytoplasmic Flow. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 11, p. 613–627, 2006.
- BRAAT, A. K.; SPEKSNIJDER, J. E.; ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. **International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 760, p. 745–760, 1999.
- FERNÁNDEZ, J. A.; BUBNER, E. J.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; WANG, T.; CUMMINS, S. F.; ELIZUR, A. Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 213, p. 16–23, 2015.
- 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**, [s. l.], v. 23, p. 977–989, 2006.
- GROSS-THEBING, T.; YIGIT, S.; PFEIFFER, J.; REICHMAN-FRIED, M.; BANDEMER, 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>>
- GÜRALP, H.; POCHERNIAIEVA, K.; BLECHA, M.; POLICAR, T.; PŠENIČKA, M.; SAITO, T. Migration of Primordial Germ Cells During Late Embryogenesis of Pikeperch *Sander lucioperca* Relative to Blastomere Transplantation. **J. Anim. Sci.**, [s. l.], v. 2017, n. 125, p. 121–129, 2017.
- HIGAKI, S.; ETO, Y.; KAWAKAMI, Y.; YAMAHA, E.; KAGAWA, N.; KUWAYAMA, M.; NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. **reproduction**, [s. l.], v. 139, p. 733–740, 2010.
- 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.
- LINHARTOVA, Z.; SAITO, T.; PŠENIČKA, M. Embryogenesis, visualization and migration of primordial germ cells in tench (*Tinca tinca*). **Journal of Applied Ichthyology**, [s. l.], v. 30, n. S1, p. 29–39, 2014.
- MISHIMA, Y.; GIRALDEZ, A. J.; TAKEDA, Y.; FUJIWARA, T.; SAKAMOTO, H.; SCHIER, A. F.; INOUE, K. Report Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by Zebrafish miR-430. **Current Biology**, [s. l.], v. 16, p. 2135–2142,

2006.

OTANI, S.; MAEGAWA, S.; INOUE, K.; ARAI, K.; YAMAHA, E. The germ cell lineage identified by vas-mRNA during the embryogenesis in goldfish. **Zoological science**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 519–526, 2002.

PEREIRA-SANTOS, M. P.; YASUI, G. S.; XAVIER, P. L. P.; DE MACEDO ADAMOV, N. S.; DO NASCIMENTO, N. F.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 795–807, 2016.

SAITO, T.; FUJIMOTO, T.; MAEGAWA, S.; INOUE, K.; TANAKA, M.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. **International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 691–700, 2006. a.

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.

SILVA, R. C.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; PAES, M. do C. F.; VALENTIN, F. N.; FUJIMOTO, T.; NASCIMENTO, N. F. Do; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. The effect of temperature on the initial development of *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 as tool for micromanipulation of embryos. **Zygote**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 1–15, 2017.

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.

YOON, C.; KAWAKAMI, K.; HOPKINS, N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 124, n. 16, p. 3157–65, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9272956>>

## 5. CAPÍTULO II: TRANSPLANTE DE CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS

### Resumo

Estratégias de conservação incluindo a consolidação de bancos genéticos e aplicação de biotecnologias de reconstituição tornam-se cada vez mais essenciais para conservação da ictiofauna. Biotécnicas como o transplante de células germinativas primordiais (PGCs) tem sido considerada como uma das principais ferramentas na reconstituição de espécies de peixes ameaçadas de extinção, por meio da geração de quimera germinativa e subsequente propagação mediada. Através desta técnica, gametas de uma espécie ameaçada de extinção podem ser gerados a partir de espécies receptoras de fácil manejo reprodutivo. Contudo, não há relatos na literatura de produção de quimeras germinativas a partir de PGCs em espécies de peixes neotropicais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi obter quimeras germinativas em peixes neotropicais, utilizando o *Astyanax altiparanae* como espécie modelo da ordem dos Characiformes. Neste estudo, foi avaliada a produção de quimeras germinativas após o transplante de PGCs de *A. altiparanae*, cultivadas em meio salino, para receptores triploides de *A. altiparanae* e híbridos triploides provenientes do cruzamento entre *A. altiparanae* (♀) e *A. fasciatus* (♂). Os resultados obtidos indicaram a migração ectópica das PGCs nos receptores triploides e híbridos triploides, não sendo observada as PGCs exógenas na região da crista gonadal dos embriões receptores. Alternativamente, foi realizado o cultivo de PGCs de *A. altiparanae* utilizando meio de cultivo celular DMEM, suplementado com aminoácidos, vitaminas, glutamina, piruvato e soro fetal bovino, em incubadora de CO<sub>2</sub>, para receptores triploides e híbridos triploides. As PGCs transplantadas, oriundas do cultivo em meio suplementado, migraram para região da crista gonadal, em 4,5% dos receptores triploides e 19,3% em receptores híbridos triploides transplantados. Posteriormente, foi realizado o transplante xenogênico, utilizando PGCs de *Prochilodus lineatus* cultivadas na solução salina e no meio suplementado, para receptores híbridos triploides, sendo observado apenas a migração ectópica das PGCs transplantadas nos receptores. Os resultados apresentados aqui são os primeiros relatos de transplante de PGCs para obtenção de quimera de linhagem germinativa em espécies neotropicais. O estabelecimento de procedimentos de micromanipulação nas espécies nativas modelo, auxiliará no emprego desta técnica para a conservação de espécies ameaçadas de extinção.

## **5.1. Material e Métodos**

Os procedimentos e as análises experimentais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Peixe – Pirassununga-SP (ICMBio/CEPTA) em consonância com o comitê de ética para o uso de animais de laboratório do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (ICMBio/CEPTA) (CEUA/CEPTA n° 02031.000033/2015-11) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ n° 4534110820).

### **5.1.1. Procedimento geral de fertilização e obtenção de embriões**

Os procedimentos gerais de fertilização e obtenção de embriões seguiram o descrito no Capítulo I. Para a coleta de gametas de *Prochilodus lineatus*, *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus* as fêmeas foram induzidas a ovulação com duas doses de extrato de hipófise, sendo a primeira dose na concentração de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> e segunda de 5,0 mg.kg<sup>-1</sup>, 8 horas após a primeira aplicação. Os machos foram induzidos a espermição com dose única, juntamente com a segunda dose da fêmea e na mesma concentração hormonal (PEREIRA-SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2017). Um par de reprodutores foi utilizado para cada repetição do estudo e os dados são uma média das repetições. Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo-da-índia (100 mg. L<sup>-1</sup>, Biodinâmica, Pinhais, Paraná, Brasil), os gametas foram coletados por extrusão, ativados pela adição de água e rapidamente homogeneizados

manualmente. Após a fertilização, uma alíquota de ovos foi imediatamente utilizada para as etapas de produção de triploides e microinjeção de mRNA.

### **5.1.2. Produção de receptores triploides de *Astyanax altiparanae* e híbridos triploides de *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus***

Oócitos de *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo) e sêmen de *Astyanax fasciatus* (lambari-do-rabo-vermelho) foram obtidos seguindo protocolos pré-estabelecidos (PEREIRA-SANTOS et al., 2016; PIVA et al., 2017). A triploidização foi realizada por choque térmico de embriões a 40°C por 2 minutos após a fertilização (ADAMOV et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017; PIVA et al., 2017).

### **5.1.3. Marcação e preparação de células germinativas primordiais para transplante**

As células germinativas primordiais de *P. lineatus* e *A. altiparanae* foram evidenciadas conforme descrito no Capítulo I. Para isso, uma pequena alíquota de ovos (~500) recém fertilizados passou pelo processo de remoção enzimática de córion. Para a retirada do córion, foram utilizadas as soluções de Characin (12 mM NaCl, 1 mM KCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) para *P. lineatus*, e de Holtfreter (10 mM NaCl, 0,67 mM KCl, 0,90 mM CaCl<sub>2</sub> e 2,40 mM NaHCO<sub>3</sub>) para *A. altiparanae*, acrescidas 0,05% de pronase (Sigma # SLMQ2345V, St. Louis,

USA). Estas soluções salinas foram previamente testadas em estudos anteriores, sendo obtidas as melhores taxas de eclosão e normalidade em embriões e larvas. Em seguida os ovos decorionados foram transferidos para placa de Petri revestidas de ágar a 1% e contendo as referidas soluções (Characin e Holtfreter) e iniciada a microinjeção de mRNA. Aproximadamente 10 nL da solução de mRNA (GFP-*nanos1* 3'UTR) concentração final de 100 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$  foram microinjetadas em blastodiscos de ovos decorionados de *P. lineatus* e *A. altiparanae*, no estágio de uma célula. A quantidade de ovos utilizados para o procedimento de microinjeção variou a cada repetição, de acordo com o tempo gasto entre fertilização, remoção de corion e injeção de mRNA, sendo influenciado pela qualidade da desova, velocidade do desenvolvimento e temperatura. Em geral, foram microinjetados de 350 a 500 embriões após a remoção do córion.

Os embriões injetados foram acompanhados até atingirem a fase de blástula e selecionados aqueles com fluorescência, momento no qual passaram pelo processo de dissociação. Para dissociação, a blastoderme foi destacada do vitelo com auxílio de uma agulha de insulina (23 gauges), desenvolvendo-se assim em formato esférico (blastosfera). As blastosferas foram lavadas com solução de Holtfreter (10 mM NaCl, 0,67 mM KCl, 0,90 mM  $\text{CaCl}_2$  e 2,40 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) para remoção total do vitelo. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de solução de citrato de sódio 0,25% na qual se procede à separação dos blastômeros. Alguns embriões foram mantidos intactos de modo a servir como controle para acompanhar o estágio de desenvolvimento das células isoladas.

Os blastômeros dissociados foram cultivados em duas diferentes soluções: 1° (solução salino): Holtfreter contendo 0.01% penicilina e 0.01% estreptomicina, cultivados a 28°C em incubadoras de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D); 2° (meio suplementado): 50% de solução de Holtfreter e 50% de meio de cultivo celular constituído por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medim – high glucose, SIGMA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO), 1X de solução de aminoácidos não essenciais MEM (MEM Non – Essential Amino Acid Solution- 100X, SIGMA), 1X de solução de MEM-vitaminas (MEM Vitamins Solution – 100X, SIGMA), 1X de solução de glutamax (L – Glutamine 100X, SIGMA), 1X de solução de antibiótico e antimicótico (Antibiotic Antymicotic Solution 100X, SIGMA ) e 1 mM de solução de piruvato (Sodium Pyruvate Solution – 100 mM, SIGMA), cultivados a 30°C em incubadora de CO<sub>2</sub>.

As células dissociadas foram cultivadas nos diferentes meios até a fase de segmentação (6-15 somitos), com aproximadamente 9 horas pós fertilização para *P. lineatus* e 7 horas pós fertilização para *A. altiparanae*, sendo o desenvolvimento embrionário acompanhado pelo grupo controle não injetado. Nesta fase do desenvolvimento, as PGCs positivas para GFP são evidenciadas, podendo ser selecionadas e o transplante ser realizado, conforme as etapas seguintes.

#### **5.1.4. Transplante de células germinativas primordiais**

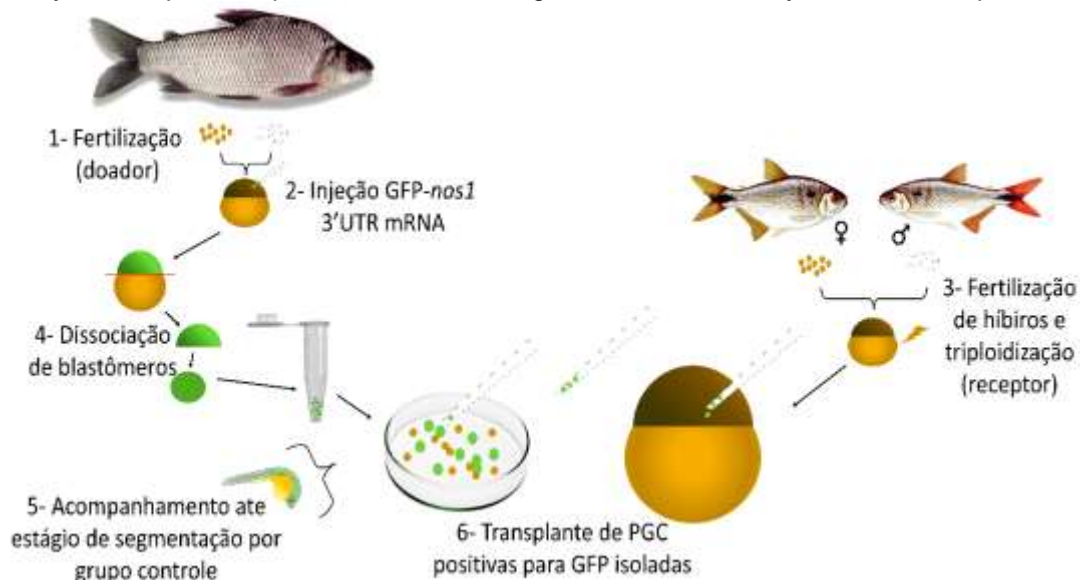
O transplante de PGC foi realizado utilizando de uma a três células GFP-positivas de *P. lineatus* e *A. altiparanae* em estágio de segmentação (6-15

somitom). As células foram aspiradas usando micropipeta de borosilicato de até 20 µm de diâmetro (Drummond, Eugene, EUA) conectada a um microinjetor (CellTram vario, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) acoplado ao micromanipulador (M-152, Narishige, Tóquio, Japão), anexo ao estereomicroscópio (SMZ18, Nikon®, Tóquio, Japão), e transplantadas para a região marginal lateral do blastoderme (SAITO et al., 2008; YASUI et al., 2011) de embriões receptores triploide de *Astyanax altiparanae* e híbridos triploides de *Astyanax altiparanae* (♀) x *Astyanax fasciatus* (♂) (PIVA et al., 2017). As etapas realizadas para o transplante de PGCs estão ilustradas na Figura 1. As estratégias de transplante de PGCs, envolvendo as espécies doadoras e receptoras, bem como os meios nos quais as células foram cultivadas e número de repetição de transplante, estão sumarizadas na Tabela 1. Para realização dos transplantes, os embriões receptores passaram pela remoção enzimática do córion como descrito no 1.1.3 do capítulo I.

Embriões transplantados e grupos controles (espécie doadora e receptora) foram mantidos em placa de Petri (90 x 15 mm) com 200 mL de solução de Holtfreter contendo 0.01% penicilina e 0.01% estreptomicina, a 26°C em incubadora demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D). O desenvolvimento embrionário, larval e migração das PGCs transplantadas foram monitoradas sob estereomicroscópio trinocular de fluorescência (Nikon SMZ18, Tóquio, Japão) (Excitation wavelength 470/40 nm) de acordo com as trocas de solução que variou de 30 a 60 minutos. Imagens digitais foram capturadas por uma câmera tipo CCD (Ds-R2i, Nikon, Tóqui, Japão) e imagens digitais foram obtidas usando o software Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão).

O quimerismo germinativo foi acompanhado por fluorescência, observando a migração e proliferação celular das células germinativas primordiais positivas para GFP transplantadas.

**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.



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

Espécies doadoras de PGCs	Meios de cultivo	Tipos de receptores	Repetições
<i>Astyanax altiparanae</i>	Salino	3n	2
		H3n	3
	Suplementado	3n	3
		H3n	3
<i>Prochilodus lineatus</i>	Salino	H3n	3
	Suplementado	H3n	2

### 5.1.5. Estatística

Os dados foram avaliados como média  $\pm$  erro padrão da média. Todos os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Lilliefors e, em seguida, submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As médias foram comparadas por meio do teste não paramétrico de amplitude múltipla de Tukey, por meio do software Statistica 10.0. Uma probabilidade de 0,05 foi estabelecida para todas as análises.

## 5.2. Resultados

Inicialmente foram feitos os transplantes alogênico utilizando células germinativas primordiais provenientes de *A. altiparanae* cultivadas em duas condições diferentes: solução salina e meio de cultivo suplementado, para receptores triploides de *A. altiparanae* e híbridos triploides do cruzamento entre *A. altiparanae* e *A. fasciatus*. Posteriormente, foi realizado o transplante xenogênico utilizando o *P. lineatus* como espécie doadora. As PGCs foram cultivadas em solução salina e meio de cultivo suplementado e transplantadas apenas em receptores de híbridos triploides do cruzamento entre *A. altiparanae* e *A. fasciatus*. Os resultados dos transplantes realizados estão sumarizados na Tabela 2.

**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.

Espécies doadoras de PGCs	Meios de cultivo	Tipos de receptores	Nº de embriões transplantados	Eclosão	Normal	Anormal
<i>A. altiparanae</i> (alogênico)	Salino	3n	86	36	20	16
		H3n	125	76	56	20
	Suplementado	3n	94	22 <sup>*4,5%</sup>	6	16 <sup>(1)</sup>
		H3n	62	31 <sup>*19,3%</sup>	12 <sup>(2)</sup>	19 <sup>(4)</sup>
<i>P. lineatus</i> (xenogênico)	Salino	H3n	51	28	15	13
	Suplementado	H3n	39	24	10	14

\* porcentagem de indivíduos com migração direcionada para região da crista gonadal; ( ) número de indivíduos com eclosão normal e anormal com migração de PGCs doadas direcionada para região da crista gonadal.

### 5.2.1. Transplante alogênico

No transplante alogênico, independente do meio no qual foram cultivadas as PGCs, a sobrevivência pós-transplante apresentou diferenças significativas durante o desenvolvimento embrionário e no percentual de larvas normais e anormais, em comparação aos grupos controles (espécie doadora e receptora). No transplante usando receptor triploide e células cultivadas em solução salina não foi verificada diferença significativa entre os grupos, entretanto foram usadas apenas duas repetições para esse tratamento (Tabela 3, 4, 5 e 6). Os transplantados apresentaram menores taxas de eclosão e com tendência para maiores taxas de eclosão anormal quando seus receptivos receptores também apresentavam maiores percentuais de anormalidades. Essa observação está

presente nas tabelas 5 e 6, nas quais os receptores tiveram mais de 30% de larvas com eclosão anormal.

Foram realizados 86 transplantes de PGCs, cultivadas em solução salina, para embriões receptores triploides, sendo obtida a eclosão de 36 embriões transplantados ( $47,5 \pm 4,5\%$ ), e destes, 20 ( $52,4 \pm 11,0\%$ ) eram normais (Tabela 2 e 3 e Fig. 2). Para os receptores híbridos triploides foram realizados 125 transplantes, no qual 76 ( $58,5 \pm 4,5\%$ ) chegaram à eclosão, e 56 ( $73,6 \pm 6,3\%$ ) eram normais (Tabela 2 e 4 e Fig. 3).

No experimento utilizando PGCs cultivadas em meio suplementado e receptores triploides, foram realizados 94 transplantes, resultando na eclosão de 22 embriões ( $34,4 \pm 10,1\%$ ), sendo 6 normais ( $20,8\% \pm 12,3\%$ ) (Tabela 2 e 5 e Fig.4). Paralelamente, as PGCs cultivadas em meio de cultivo suplementado e transplantadas em receptores híbridos triploides, foram realizados 62 transplantes, com eclosão de 31 embriões ( $53,8 \pm 10,6\%$ ), sendo 12 normais ( $41,8 \pm 13,8\%$ ) (Tabela 2 e 6 e Fig. 5).

Nos experimentos realizados utilizando o transplante de PGCs cultivadas em meio salino, foram observados que as PGCs transplantadas em todos os embriões apresentaram migração ectópicas, independentemente do tipo de receptor, sendo visualizadas as células GFP-positivas na região cefálica, vitelo e musculatura (Fig. 2 e 3). Apenas em um receptor híbrido triploide, foi verificada a migração da PGCs do doador, muito próxima da região de formação da crista gonadal (Fig. 3). Este embrião teve eclosão anormal e morreu aos dois pós-eclosão. Os transplantes foram realizados utilizando 1 a 3 PGCs doadoras, e foi observado divisão celular em 2 ( $5,5\%$ ) embriões de receptores triploides e em 1 ( $1,3\%$ ) embrião híbrido triploide, sendo observado nestes embriões, na fase de

eclosão, de 4 a 6 células GFP positivas. O embrião presuntivamente quimérico não foi observado a divisão celular.

Nos experimentos de transplante de PGCs cultivadas em meio suplementado, foram observadas a migração direcionada para região de formação da crista gonadal em 1 (4,5%) embrião transplantado triploide, sendo que este embrião apresentou eclosão anormal (Tabela 2 e Fig. 4). No entanto, quando o transplante foi realizado em receptores híbridos triploides, foram observadas células GFP-positivas com migração direcionada para região da crista gonadal em 6 (19,3%) embriões, sendo eles 2 com eclosão normal e 4 com eclosão anormal (Tabela 2 e Fig. 5).

A proliferação celular das células transplantadas foi observada em 3 (13,6%) embriões triploides transplantados e em 5 (16,1%) de híbridos triploides, independentemente do local de migração final das PGCs. Este experimento foi realizado como aquele utilizando PGCs cultivadas em solução salina, sendo transplantado de 1 a 3 células. Na eclosão foram observadas de 4 a 6 células GFP positivas, exceto para dois transplantados de híbridos triploides que eclodiram com 9 e 12 células, sendo observado nestes embriões uma queda drástica da expressão de GFP nas células transplantadas em 1 dia pós-eclosão (Fig. 5).

**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.

Grupos	n	Não fertilizados	Clivagem	Blastula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
Doador	91	0.0 ± 0.0%	100 ± 0.0%	99.0 ± 0.6%	99.0 ± 0.6%	98.0 ± 1.2%	95.8 ± 1.0%	90.0 ± 5.8%	10.0 ± 5.8%
Receptor	100	0.0 ± 0.0%	100.0 ± 0.0%	100.0 ± 0.0%	99.0 ± 0.6%	93.0 ± 4.0%	74.0 ± 1.2%	86.3 ± 3.3%	13.7 ± 3.3%
Transplantados	86	-	-	94.8 ± 1.2%	78.8 ± 6.7%	56.0 ± 12.4%	47.5 ± 11.7% (36)	52.4 ± 11.0% (20)	47.6 ± 11.0% (16)
<b>P-value</b>				0,1255	0,1899	0,1871	0,1340	0,2217	0,2217

**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.

Grupos	n	Não fertilizados	Clivagem	Blastula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
Doador	146	0.7 ± 0.0%	99.3 ± 0.6%	98.6 ± 0.6%	97.1 ± 1.2%	89.6 ± 1.9% <sup>a</sup>	88.9 ± 2.1% <sup>a</sup>	97.1 ± 2.4% <sup>a</sup>	2.9 ± 2.4% <sup>a</sup>
Receptor	150	1.4 ± 0.0%	98.6 ± 1.1%	97.3 ± 2.2%	92.0 ± 4.1%	84.0 ± 1.6% <sup>a</sup>	82.0 ± 1.6% <sup>a</sup>	95.9 ± 1.4% <sup>a</sup>	4.1 ± 1.4% <sup>a</sup>
Transplantados	125	-	-	89.2 ± 8.0%	83.1 ± 9.1%	63.4 ± 3.7% <sup>b</sup>	58.5 ± 4.5% <sup>b</sup> (76)	73.6 ± 6.3% <sup>b</sup> (56)	26.4 ± 6.3% <sup>b</sup> (20)
<b>P-value</b>				0.5164	0.4220	0.0026	0.0025	0.0246	0.0246

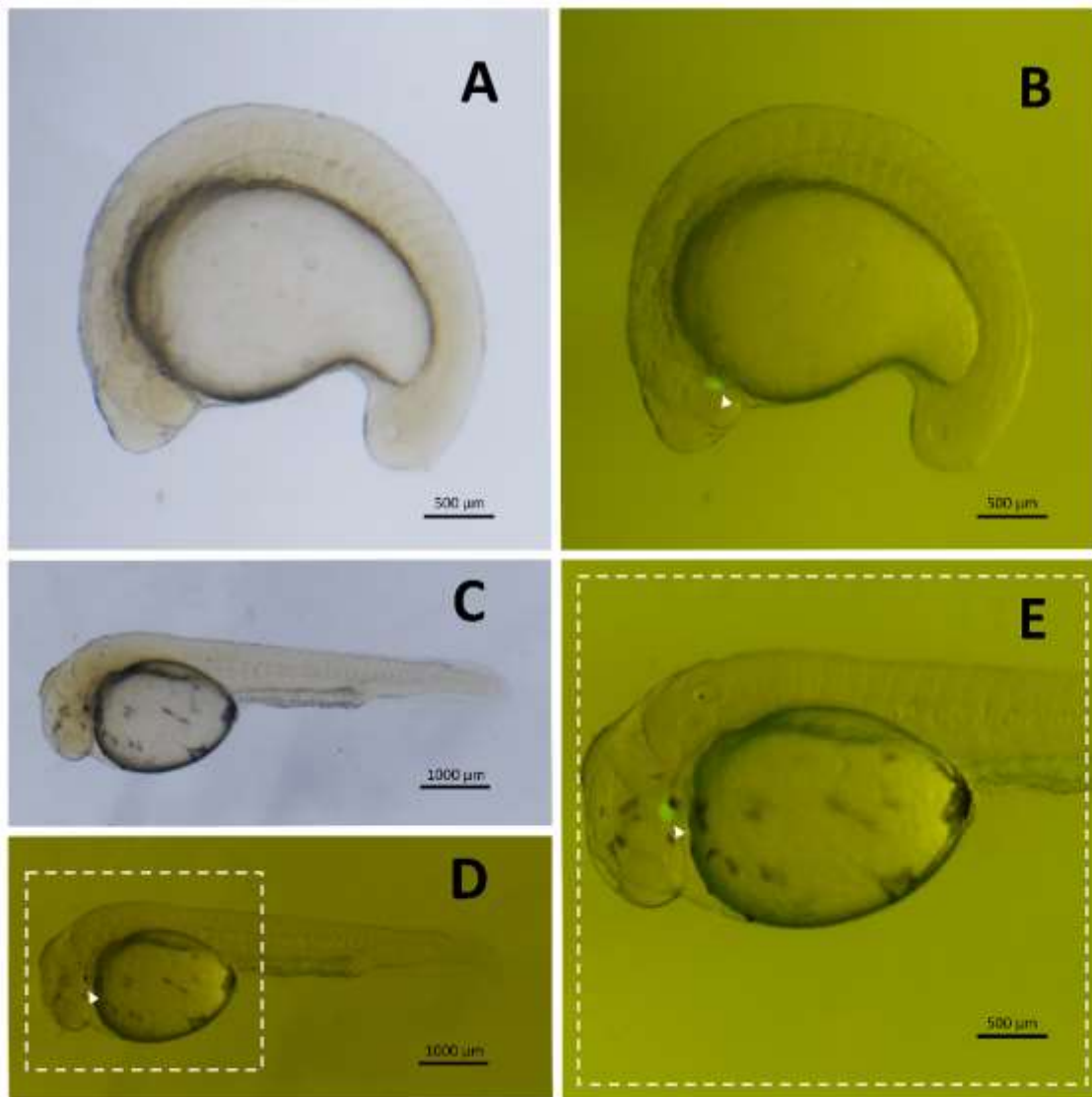
**Tabela 5:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles (doador e receptor) e dos receptores triploides transplantados GFP positivos, utilizando PGCs de *A. altiparanae*, oriundas do meio de cultivo suplementado.

Grupos	N	Não fertilizados	Clivagem	Blastula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
Doador	188	7.3 ± 0.0%	92.8 ± 4.4%	92.7 ± 4.4%	80.0 ± 4.3%	78.0 ± 3.3% <sup>b</sup>	76.9 ± 4.2% <sup>b</sup>	96.1 ± 2.5% <sup>b</sup>	3.9 ± 2.5% <sup>a</sup>
Receptor	152	7.2 ± 0.0%	92.8 ± 3.1%	82.8 ± 2.8%	72.3 ± 1.6%	62.9 ± 2.0% <sup>ab</sup>	49.2 ± 8.1% <sup>ab</sup>	66.8 ± 12.6% <sup>ab</sup>	33.2 ± 12.6% <sup>ab</sup>
Transplantados	94	-	-	96.4 ± 1.8%	87.3 ± 7.6%	43.6 ± 8.5% <sup>a</sup>	34.3 ± 10.1% <sup>a</sup> (22)	20.8 ± 12.3% <sup>a</sup> (6)	79.2 ± 12.3% <sup>b</sup> (16)
<b>P-value</b>				0,108	0,312	0,0286	0,0462	0,0153	0,0153

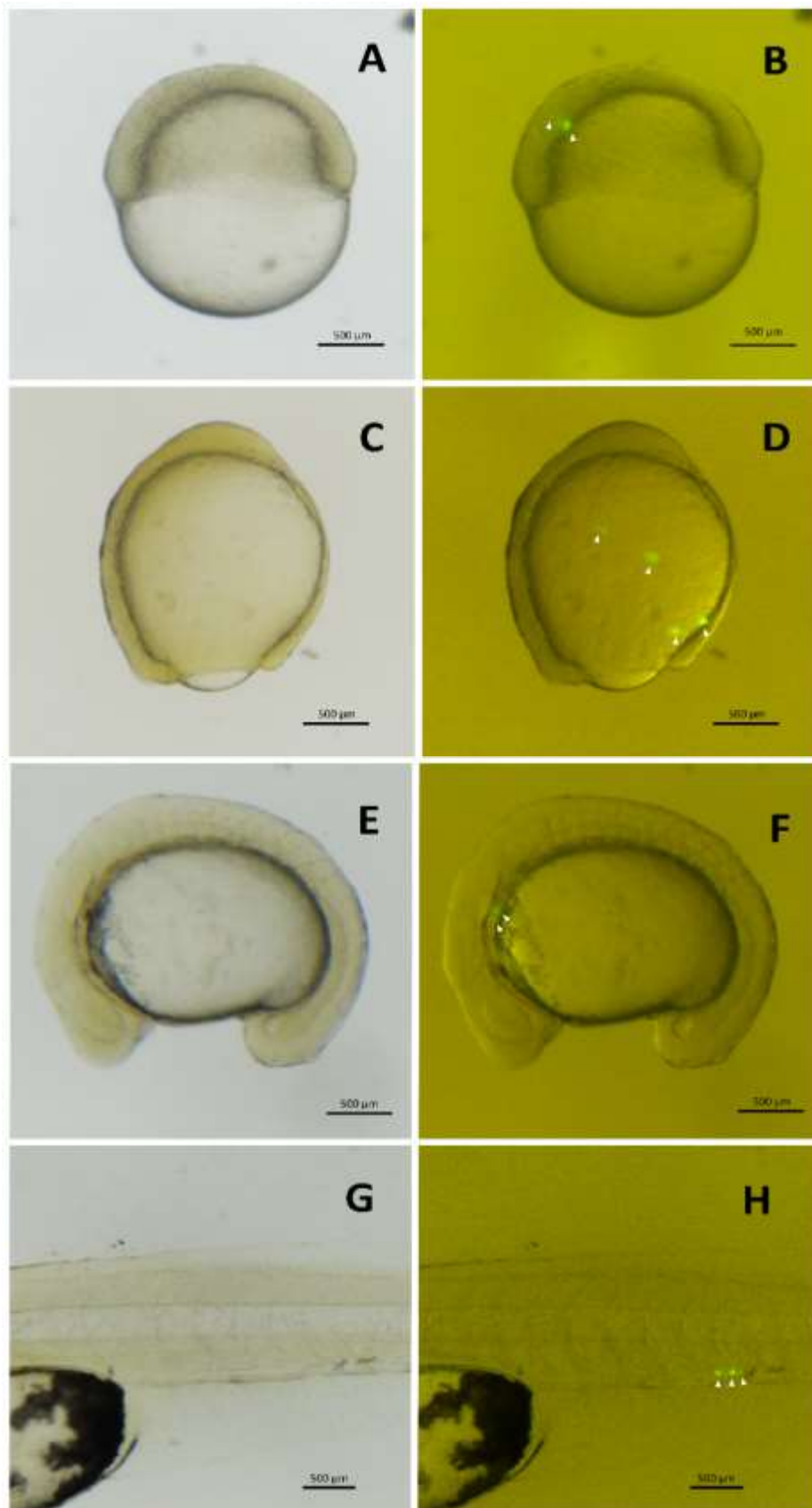
**Tabela 6:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles (doador e receptor) e dos receptores híbridos triploides transplantados GFP positivos, utilizando PGCs de *A. altiparanae*, oriundas do meio de cultivo suplementado.

Grupos	n	Não fertilizados	Clivagem	Blastula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
Doador	196	7.2 ± 0.0%	92.8 ± 4.5%	92.3 ± 4.2%	82.9 ± 6.3%	81.1 ± 5.1%	77.7 ± 4.6%	91.4 ± 3.1% <sup>b</sup>	8.6 ± 3.1% <sup>a</sup>
Receptor	193	1.0 ± 0.0%	99.0 ± 0.8%	89.5 ± 6.4%	88.0 ± 7.1%	65.6 ± 10.2%	55.0 ± 14.0%	68.7 ± 6.3% <sup>ab</sup>	31.3 ± 6.3% <sup>ab</sup>
Transplantados	62	-	-	93.1 ± 2.9%	86.6 ± 3.0%	68.7 ± 10.7%	53.8 ± 10.6% (31)	41.8 ± 13.8% <sup>a</sup> (12)	58.2 ± 13.8% <sup>b</sup> (19)
<b>P-value</b>				0,8999	0,8710	0,5983	0,3899	0,0499	0,0499

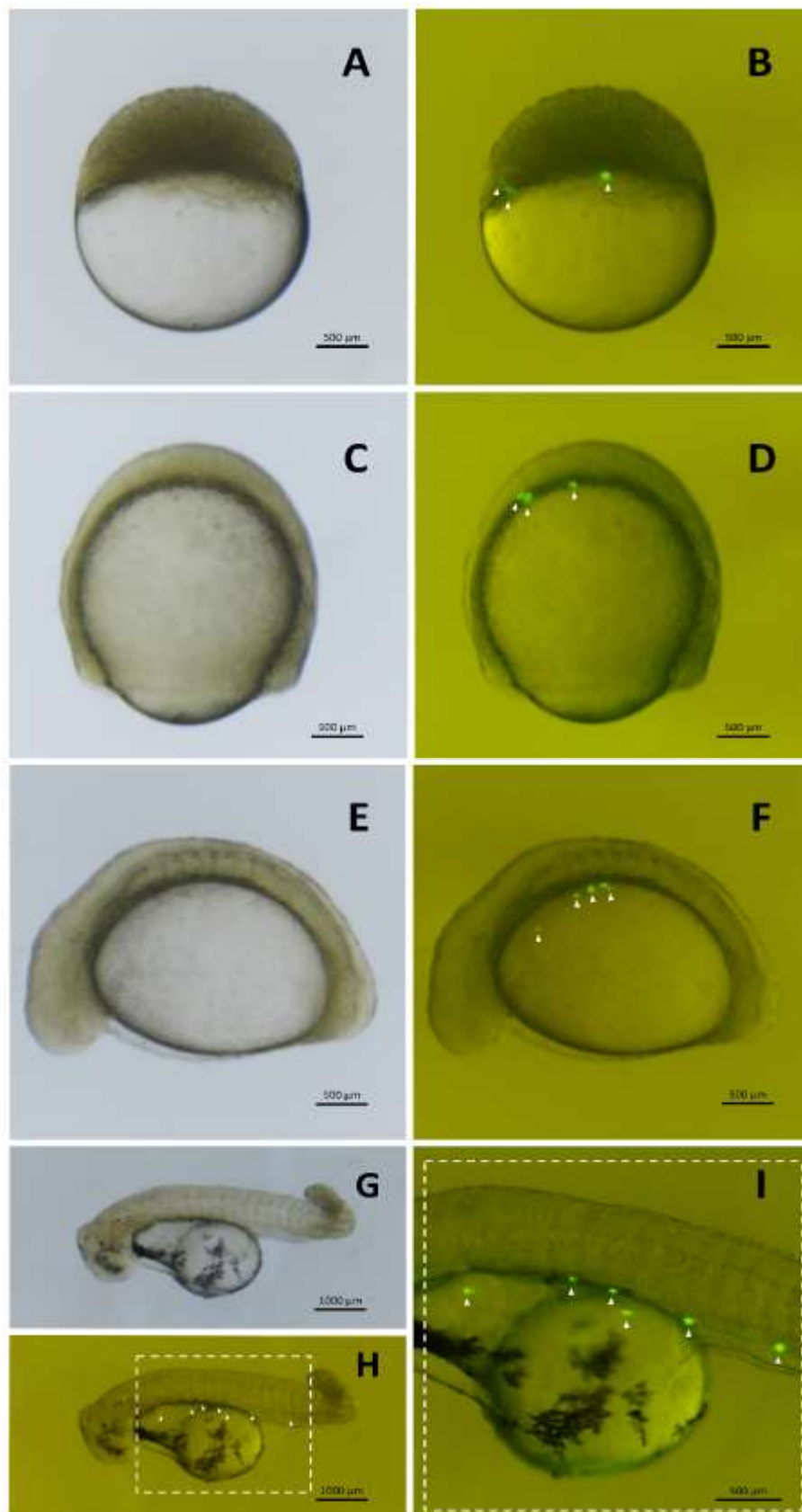
**Figura 2:** Embriões triploides transplantados com PGCs GFP positivas de *A. altiparanae*, cultivadas em solução salina. **A e B** - Embriões com 20 somitos. **C e D** - Embrião na fase de eclosão. **E** - Detalhe da região destacada em **D**. (PGCs, ponta da seta). **B e D** são imagens capturadas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



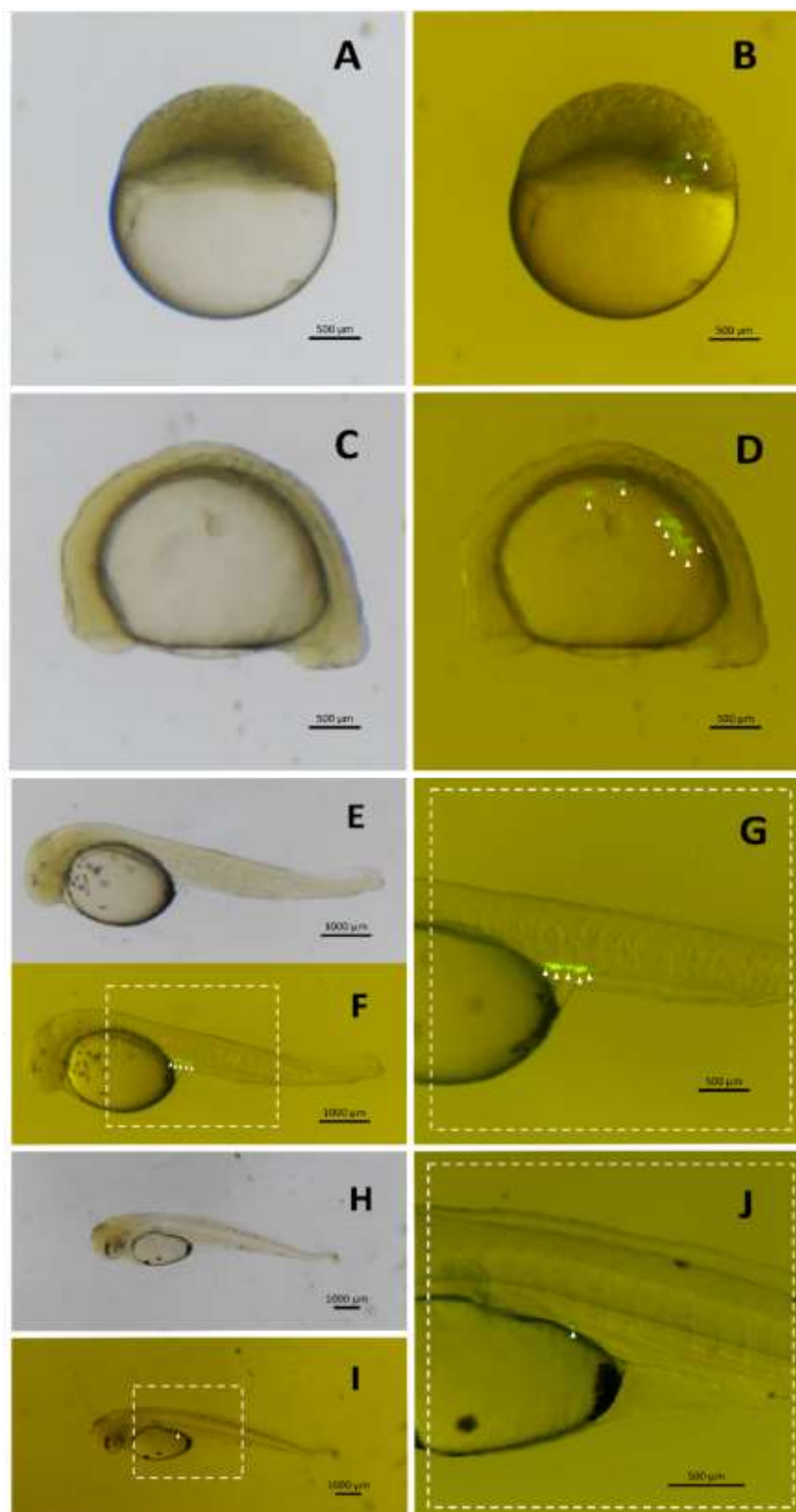
**Figura 3:** Embriões híbridos triploides transplantados com PGCs GFP positivas de *A. altiparanae*, cultivadas em solução salina. **A e B** - Embriões em fase de gástrula com 30% de epibolia. **C e D** - Embriões em fase de gástrula com 90% de epibolia. **E e F** - Embriões com 16 somitos. **G e H** - 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.



**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.



**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.



### 5.2.2. Transplante xenogênico

O transplante xenogênico foi realizado apenas em receptores híbridos triploides, utilizando PGCs de *P. lineatus* cultivadas em meio salino e de cultivo celular suplementado. O grupo transplantado com PGCs cultivadas em solução salina e grupos controles (espécie doadora e receptora) apresentam diferenças significativas quanto a porcentagem de eclosão e de larvas normais e anormais (Tabela 7). Enquanto que para o grupo transplantado com PGCs cultivadas em meio suplementado e grupos controles foram observados diferenças significativas apenas na fase de gastrulação (Tabela 8), contudo apenas duas repetições foram possíveis de serem realizadas para este tratamento. Assim como no transplante alogênico, transplantados tiveram maiores percentuais de embriões anormais na eclosão quando o grupo controle receptor apresentou mais que 30% de eclosão anormal (Tabela 8).

No total, foram realizados 51 transplantes utilizando células cultivadas em meio salino, sendo obtida a eclosão de 28 embriões ( $54,3 \pm 4,5\%$ ), dos quais 15 ( $44,2 \pm 9,4\%$ ) eram normais (Tabela 2 e 7 e Fig. 6). Para as PGCs cultivadas em meio suplementado, foi obtido 39 transplantes, com eclosão de 24 embriões ( $60,6 \pm 1,3\%$ ), sendo 10 ( $42,0\% \pm 0,5\%$ ) normais (Tabela 2 e 8 e Fig.7).

Em todos os embriões provenientes do transplante xenogênico, foi observado que as PGCs apresentaram migração ectópica, sendo visualizadas as células GFP-positivas na região cefálica, vitelo e músculo. A divisão celular das células transplantadas foi observada em 1 (3,5%) embrião proveniente do transplante a partir de PGCs cultivadas em meio salino, e em 2 (9,5%) embriões transplantados com PGCs cultivadas em meio suplementado, sendo

transplantado de 1 a 3 células na fase blástula e verificado na eclosão de 4 a 6 células GFP positivas.

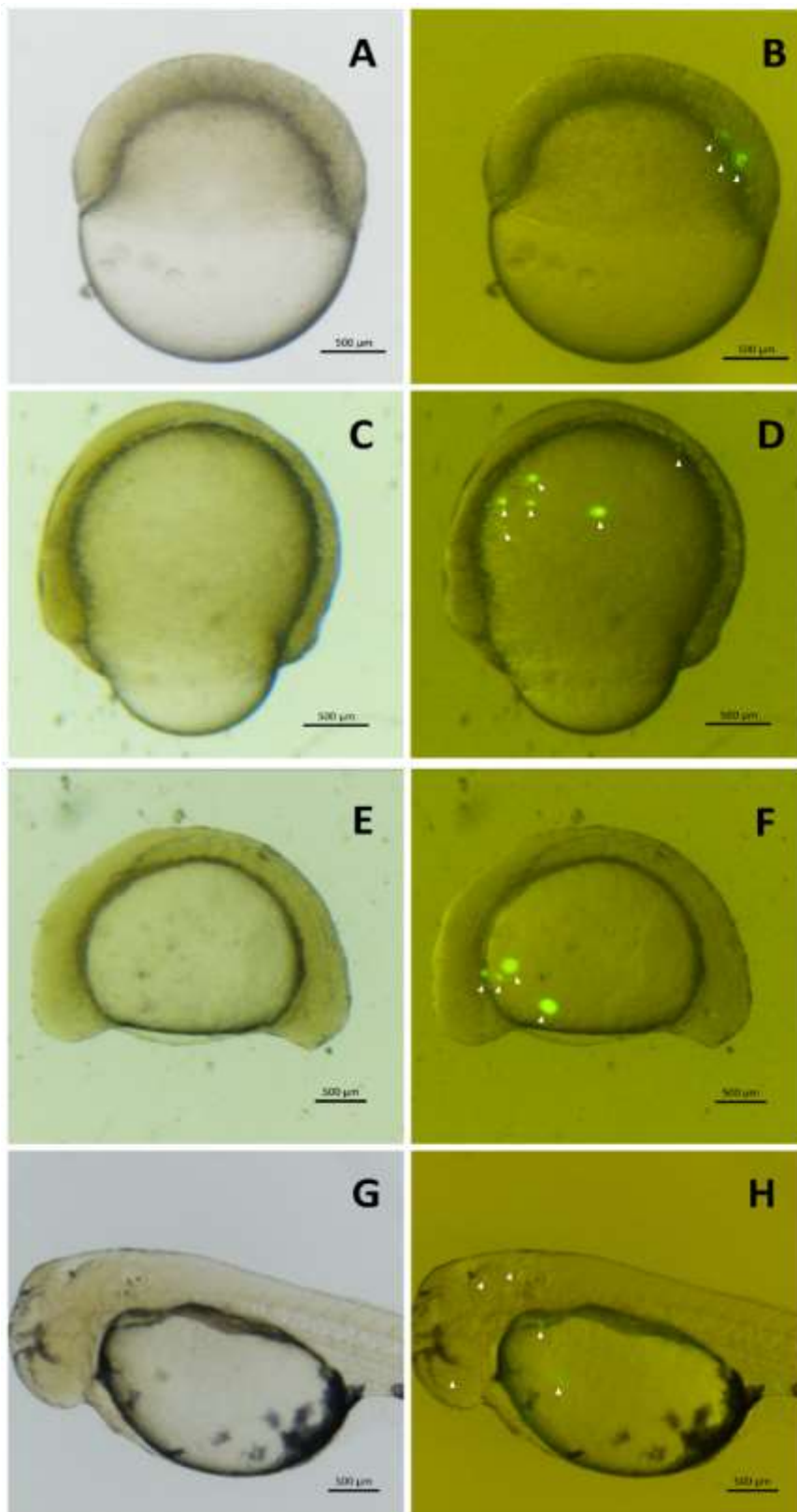
**Tabela 7:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles e de transplantados em receptores híbridos triploides com PGCs GFP positivas de *P. lineatus* cultivadas em meio salino.

Grupos	n	Não fertilizados	Clivagem	Blastula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
<b>Doador</b>	150	2.1 ± 0.0%	97.9 ± 1.0%	88.7 ± 5.2%	76.0 ± 1.9%	61.3 ± 3.9%	58.7 ± 4.5% <sup>ab</sup>	96.0 ± 3.3% <sup>a</sup>	4.0 ± 3.3% <sup>a</sup>
<b>Receptor</b>	150	0.7 ± 0.0%	99.3 ± 0.5%	98.0 ± 0.9%	90.0 ± 3.4%	83.3 ± 5.2%	81.3 ± 5.2% <sup>a</sup>	96.6 ± 0.8% <sup>a</sup>	3.4 ± 0.8% <sup>a</sup>
<b>Transplantados</b>	51	-	-	97.8 ± 1.8%	82.0 ± 3.6%	65.3 ± 4.2%	54.3 ± 4.5% <sup>b</sup> (28)	55.8 ± 9.4% <sup>b</sup> (15)	44.2 ± 9.4% <sup>b</sup> (13)
<b>P-value</b>				0.2379	0.0986	0.0612	0.0339	0.0028	0.0028

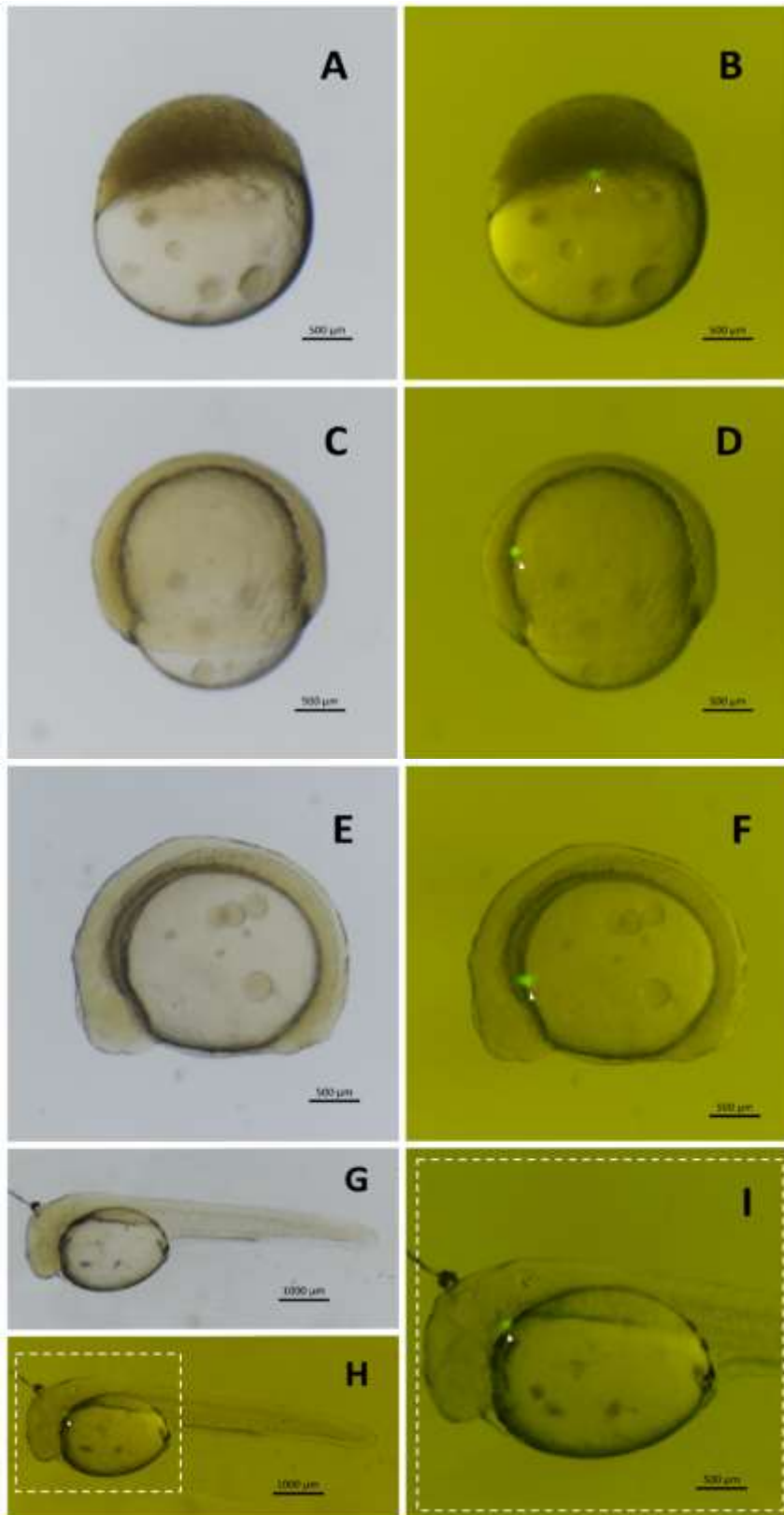
**Tabela 8:** Desenvolvimento embrionário dos grupos controles e de transplantados em receptores híbridos triploides com PGCs GFP positivas de *P. lineatus* cultivadas em meio suplementado.

Grupos	n	Não fertilizados	Clivagem	Blastula	Gastrula	Segmentação	Eclosão	Larvas	
								Normal	Anormal
<b>Doador</b>	66	3.1 ± 0.0%	96.9 ± 0.0%	93.9 ± 0.0%	86.4 ± 0.0% <sup>b</sup>	83.3 ± 0.0%	68.2 ± 0.0%	86.7 ± 0.0%	13.3 ± 0.0%
<b>Receptor</b>	114	0.0 ± 0.0%	100 ± 0.0%	97.5 ± 1.4%	96.6 ± 0.9% <sup>c</sup>	67.8 ± 12.2%	54.2 ± 16.8%	70,0 ± 9.6%	30.0 ± 9.6%
<b>Transplantados</b>	39	-	-	90.3 ± 0.8%	76,4 ± 0.8% <sup>a</sup>	62.5 ± 2.4%	60.6 ± 1.3% (24)	42.0 ± 0.5% (10)	58,0 ± 0.5% (14)
<b>P-value</b>				0,1180	0,0031	0,5417	0,8486	0,1000	0,1000

**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.



**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.



### 5.3. Discussão

A marcação de PGCs de *A. altiparanae* (dados não publicados) e *P. lineatus* (Coelho et al., 2019 – dados capítulo I), utilizando a microinjeção de mRNA sintetizado *in vitro*, contendo a região codificante da GFP em fusão com a região reguladora de tradução 3'UTR do *nanos1* de zebrafish possibilitou a visualização e seleção destas células, bem como a realização do transplante e o rastreamento das PGCs nos receptores pela microscopia de fluorescência. Avaliamos assim, a taxa de obtenção de quimeras de linhagem germinativas por meio do transplante de PGCs de *A. altiparanae* e *P. lineatus* cultivadas em meio salino e em meio suplementado, para receptores triploides e híbridos triploides. Apenas PGCs de *A. altiparanae* cultivadas em meio suplementado apresentaram migração direcionada para região da crista gonadal nos receptores.

As PGCs transplantadas que tiveram migração direcionada apresentaram comportamento semelhante aos das PGCs da espécie *Astyanax altiparanae* (dados não publicados). Nos estudos realizados de rastreamento de PGCs em embriões de *A. altiparanae* na fase de 6 a 19 somitos, fase utilizada para transplante, foram visualizadas de 3 a 12 PGCs posicionadas em grupos ou espalhadas pela extensão do vitelo. Enquanto que na fase de eclosão foram encontradas de 3 a 13 PGCs posicionadas na grande maioria na extensão do vitelo, com alguns casos na parte superior do vitelo. Estes dados são similares aos encontrados nos receptores transplantados.

Trabalhos que utilizam esse tipo de técnica são considerados valiosos para a conservação de espécies ameaçadas. Na literatura há relatos da geração de quimera de linhagem germinativa a partir do uso de PGCs como células

doadoras, com migração direcionada para região da crista gonadal e em alguns obtiveram a produção de espermatozoides e descendentes (CIRUNA et al., 2002; KAWAKAMI et al., 2010; SAITO et al., 2008, 2010, 2011; YASUI et al., 2011). Esses trabalhos apresentaram entre 1,3% a 63,5% de PGCs com migração para região da crista gonadal em quimeras de linhagem germinativa, contudo, também relataram as altas taxas de migração ectópicas.

O sucesso do transplante está diretamente relacionado a correta migração das células doadas para região de formação gonadal na espécie receptora. Há também uma tempo ideal para que as células sejam transplantadas, devido a capacidade de migração, que pode diminuir com o passar do tempo (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2003; YAMAHA et al., 2007). Usualmente, as PGCs são dissociadas e coletadas para o transplante em doadores em fase de segmentação (10 a 15 somitos), momento em que ainda estão em migração ao longo da lateral dos somitos em direção a região de formação da crista gonadal (SAITO et al., 2008).

KAWAKAMI et al., (2010) e SAITO et al., (2010) avaliaram diferentes estágios e tempo de cultivo para o transplante, as melhores taxas de migração direcionada estava relacionada a obtenção de PGCs em embriões doadores em fases iniciais de segmentação (6 – 17 somitos) e com período de cultivo mais curto (1 dia). Em nosso estudo, seguimos o proposto por YASUI et al., (2011), feito a dissociação em fase de blástula e cultivados os blastômeros até o estágio de segmentação (6 – 15 somitos) momento em que a expressão da fluorescência nas PGCs são mais evidentes que nos outros tipos celulares dos embriões, possibilitando assim, a seleção das células para o transplante.

Com a dissociação e transplante realizado na fase de segmentação (10 - 15 somitos), SAITO et al., (2008, 2010) obtiveram a migração direcionada das PGCs em mais de 46,2% e 30% de embriões, respectivamente. KAWAKAMI et al., (2010) relatam a migração de PGCs variando de 18,4% a 21,4% dos embriões transplantados. Seguindo a metodologia de dissociação em fase de blástula e cultivo até segmentação, após a criopreservação das PGCs, YASUI et al., (2011) obtiveram taxa de 16,5% de migração de PGCs direcionada para região da crista gonadal.

Em espécies frequentemente utilizadas em sistemas de micromanipulação (experimentais), como *Danio rerio*, *Carassius auratus*, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Danio albolineatus* e trutas, desenvolvem-se bem meio salino, como a solução de Ringer. Essa solução é utilizada para remoção do córion, cultivo embrionário e cultivo de PGCs, sendo geralmente acrescida de penicilina e estreptomicina (HIGAKI et al., 2010; KAWAKAMI et al., 2010; SAITO et al., 2008) e soro fetal bovino ou albumina (FUJIMOTO et al., 2006; NAYA et al., 2020; SAITO et al., 2010; YOSHIZAKI et al., 2005). Entretanto, tem sido verificado que nas espécies em estudo, as melhores condições de cultivo embrionário variam de uma espécie para outra. *A. altiparanae* desenvolve-se bem em Holtfreter e *P. lineatus* em Characin (dados não publicados), o que muitas vezes dificulta na escolha da melhor solução na hora de realizar o cultivo das PGCs. Neste estudo, foi verificado que as PGCs apresentaram melhores resultados em relação a aparência, expressão GFP e aumento do número celular quando cultivadas em solução de Holtfreter, comparado a solução Characin, (dados não publicados). No entanto, a migração de PGCs direcionada só foi obtida quando utilizado um meio de cultivo celular suplementado, enriquecido

com aminoácidos, vitaminas, glutamina, piruvato e soro fetal bovino, sendo realizado o cultivo em incubadora de CO<sub>2</sub>, e apenas no transplante alogênico. Esse relato é importante, pois indica que o sucesso no transplante e constituição de quimeras germinativas podem ser influenciados pelo meio de cultivo.

As condições e tempo de cultivo dessas células podem estar relacionados a viabilidade e expressão de genes importantes para manutenção das PGCs e conseqüentemente, nas taxas de migrações. Diversos genes estão relacionados a diferenciação, manutenção e migração de PGCs. Foi relatado que a deficiência das proteínas *cxcr4b* e seu ligante *sdf-1* e/ou *dnd1*, interferem na migração das PGCs, sendo estas localizadas em posições ectópicas ou ativarem o processo de apoptose (BARTON; LEBLANC; LEHMANN, 2016; GROSS-THEBING et al., 2017; HERPIN et al., 2008; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2010; WEIDINGER et al., 2003). De acordo com GROSS-THEBING et al., (2017), PGCs com depleção de *cxcr4b*, mas com expressão para *dnd1*, podem ser localizadas ectopicamente, mantendo ainda sua morfologia. A depleção de *dnd1* pode causar alterações na morfologia das PGCs, levando a diminuição gradual da expressão de marcadores de células germinativas ou causando apoptose, desta forma, impedindo o acompanhamento dessas células no transplante e até impossibilitando a correta migração para a cristal gonadal. Para a espécie do presente estudo, a verificação da expressão dos genes supracitados seria uma possível estratégia para elucidar pontos importantes em relação à migração das células para a região das cristas gonadais, uma vez que a alteração no cultivo proporcionou migração celular.

Assim como descrito nos trabalhos de transplante presentes na literatura, foi observado a migração das células transplantadas com pouca ou nenhuma

divisão celular, exceto para dois transplantados de células cultivadas em meio suplementado para receptor híbrido triploide que eclodiram com 9 e 12 células, apresentando padrão semelhante à *A. altiparanae*. Contudo, a expressão das células GFP nesses dois embriões diminuíram drasticamente 1 dia pós-eclosão. As células GFP-positivas, presuntivamente PGCs, são visualizadas em até 18 dias pós-eclosão no estudo de rastreabilidade em *A. altiparanae* (dados não publicados), apresentando diminuição de células em relação ao aumento de dias pós-eclosão.

SAITO et al., (2008) verificaram que na maioria dos embriões transplantados não ocorria a divisão celular das PGCs, e quando ocorreu, as PGCs exógenas dividiram-se uma vez, enquanto PGCs endógenas do receptor aumentam em número mais de 5 vezes no mesmo período. SAITO et al., (2010) relataram a proliferação das células transplantadas em torno de 6 a 7 dias pós-fertilização, mesmo período de ocupação e proliferação das PGCs e do início de formação das gônadas do hospedeiro. No entanto, a diminuição ou desaparecimento de PGCs GFP-positivas foi relado em transplante envolvendo espécies de ordens diferentes (SAITO et al., 2011, 2014) e entre híbrido e espécie pura (NAYA et al., 2020). Contudo, os resultados demonstram que o mecanismo de migração de PGCs durante o desenvolvimento embrionário é altamente conservado entre espécies distantemente relacionadas e portanto, as PGCs transplantadas são capazes de migrar, proliferar e colonizar as gônadas do receptor, mesmo em um ambiente não-específico.

Diante da grande diversidade em estratégias reprodutivas, tipos de desovas, tamanho de gametas, faixa de temperatura específica para o desenvolvimento embrionário e a sensibilidade para o manuseio em etapas de

micromanipulação, as metodologias desenvolvidas para a produção de quimera germinativa podem variar e receber adaptações de acordo com a espécie utilizada. Desta forma, cada espécie pode apresentar um desafio diferente durante a aplicação da técnica de transplante, que por sua vez já é invasiva.

Para o transplante de PGCs é essencial ter domínio prévio da reprodução *in vitro* para se obter a marcação e isolamento da PGCs, o que é dificultado na maioria das espécies em risco de extinção. Além disso o transplante de PGCs requer padronização no desenvolvimento entre espécies doadoras e receptoras, na qual cada espécie apresenta uma faixa de temperatura específica para o desenvolvimento ideal do embrião (ARASHIRO et al., 2018; COELHO et al., 2019; PEREIRA-SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2017).

O tamanho e o tempo de desenvolvimento embrionário das espécies podem dificultar a aplicabilidade de algumas técnicas de transplante. Assim como a nossa espécie modelo *Astyanax altiparanae* outras espécies como *Danio rerio*, *Oryzias latipes* e *Misgurnus anguillicaudatu* apresentam ovos e larvas pequenos, dificultando a utilização de alguns métodos utilizados em truta (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2003). O tempo de desenvolvimento embrionário das espécies neotropicais pode variar de 11 a 29 h (ARASHIRO et al., 2018; COELHO et al., 2019; PEREIRA-SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2017), diferindo das espécies mais comumente utilizadas nos trabalhos de transplantes, que pode levar de 72 h a dias para a eclosão (FUJIMOTO et al., 2006; IWAMATSU, 2004; KIMMEL et al., 1995). Em salmonídeos, por exemplo, onde as técnicas de transplante de células são bastante avançado (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2003; KOBAYASHI et al., 2007; NAGASAWA et al., 2013), existem facilidades biológicas intrínsecas que otimizam o transplante,

como desenvolvimento embrionário lento (32-83 dias, o que aumenta o tempo de transplante), tamanho do embrião maior (facilitando a visualização e micromanipulação), aclimatação em sistema de micromanipulação (placa de Petri), além do suporte científico, que por serem um grupo consagrado nas ciências básicas e na aquicultura dispõe de informações importantes referentes à genética (sequências gênicas e suas expressões), reprodução, fisiologia, dentre outras áreas importantes ao transplante de PGCs. No caso de espécies nativas, como é o caso do presente trabalho, embora tenham ocorrido grande progresso nos trabalhos recentes (YASUI et al., 2014; PEREIRA-SILVA 2016; PIVA et al., 2017; do NASCIMENTO 2017; BERTOLINI 2017; ARASHIRO et al., 2018; COELHO et al., 2019; do NASCIMENTO et al., 2020; YASUI et al., 2020; COELHO et al., 2021), ainda faltam informações básicas que dêem suporte a estas técnicas avançadas de quimerismo.

Os resultados apresentados aqui são os primeiros relatos de transplante de PGCs para obtenção de quimera de linhagem germinativa em espécies neotropicais. O conhecimento a respeito do comportamento de espécies nativas modelo em sistemas de micromanipulação, auxilia no emprego da técnica para conservação de espécies ameaçadas de extinção. Entretanto ainda há necessidade melhorias nas etapas do transplante e conhecimento a respeito do comportamento celular nos sistemas de cultivo, tempo para transplante, condições dos receptores, a interação intercelular entre células germinativas (doadas) e células somáticas (receptor) e atuação de genes relacionados a manutenção e caracterização de células germinativas primordiais em espécies nativas.

## Referências

ADAMOV, N. S. de M.; NASCIMENTO, N. F. Do; MACIEL, E. C. S.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; CALADO, L. L.; EVANGELISTA, M. M.; NAKAGHI, L. S. O.; GUERRERO, A. H. M.; FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra , *Astyanax altiparanae* , Using Temperature Shock : Tools for Conservation and Aquaculture. **JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY** doi:, [s. l.], 2016.

ARASHIRO, D. R.; YASUI, G. S.; CALADO, L. L.; PEREIRA-SANTOS, M.; LEVY-PEREIRA, N.; MONZANI, P. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SENHORINI, J. A. Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation. **Zygote**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 1–14, 2018.

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>>

BERTOLINI, R. M.; SENHORINI, J. A.; NASCIMENTO, N. F. Do; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; PERES, W. A. M.; SILVA, R. C. Da; YASUI, G. S. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* : An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 49, p. 68–74, 2017.

BERTOLINI, R. M.; LOPEZ, L. S.; DO NASCIMENTO, N. F.; ARASHIRO, D. R.; DE SIQUEIRA SILVA, D. H.; DOS SANTOS, S. C. A.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S. Strategies for aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*. **Aquaculture International**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 127–137, 2020.

CIRUNA, B.; WEIDINGER, G.; KNAUT, H.; THISSE, B.; THISSE, C.; RAZ, E.; SCHIER, A. F. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. **Proc Natl Acad Sci**, [s. l.], v. 99, p. 14919– 14924, 2002.

COELHO, G. C. Z.; YO, I. S.; MIRA-LÓPEZ, T. M.; YASUI, G. S. Preparation of a fish embryo for micromanipulation : staging of development , removal of chorions and traceability of PGC in *Prochilodus lineatus*. **The International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 65, p. 57–65, 2019. COELHO, G. C. Z.; ARASHIRO, D. R.; DISSELLI, T.; PEREIRA-SANTOS, M.; MIRA-LÓPEZ, T. M.; MONZANI, P. S.; SENHORINI, J. A.; FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S. Developmental stages , incubation temperature , and in vivo traceability of primordial germ cell in an important aquaculture species *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 535, n. 0044–8486, p. 1–11, 2021.

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**, [s. l.], v. 23, p. 977–989, 2006.

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>>

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.

HIGAKI, S.; ETO, Y.; KAWAKAMI, Y.; YAMAHA, E.; KAGAWA, N.; KUWAYAMA, M.; NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. **reproduction**, [s. l.], v. 139, p. 733–740, 2010.

IWAMATSU, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes* q. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 121, p. 605–618, 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. **The International journal of developmental biology**, [s. l.], v. 54, n. 10, p. 1493–1501, 2010.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **Developmental Dynamics**, [s. l.], v. 10, p. 253–310, 1995.

KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Generation of Viable Fish From Cryopreserved Primordial Germ Cells. **MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT**, [s. l.], v. 74, p. 207–213, 2007.

NAGASAWA, K.; FERNANDES, J. M. O.; YOSHIZAKI, G.; MIWA, M.; BABIAK, I. Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: Characterization of *Vasa*, *Dead End*, and *Lymphocyte antigen 75* genes. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 118–131, 2013.

NASCIMENTO, N. F. Do; PEREIRA-SANTOS, M.; LEVY-PEREIRA, N.; MONZANI, P. S.; NIEDZIELSKI, D.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock : The first case in Neotropical characins. **Aquaculture**, [s. l.], v. 520, p. 734938, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734938>>NASCIMENTO, N. F. Do; SIQUEIRA-SILVA, D. H. De; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* ( Garutti & Britski ) in laboratory conditions. **Zygote**, [s. l.], p. 1–8, 2017.

NAYA, Y.; MATSUNAGA, T.; SHIMIZU, Y.; TAKAHASHI, E.; SHIMA, F.; ENDOH, M.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Developmental potential of somatic and germ cells of hybrids between *Carassius auratus* females and *Hemigrammocypris rasborella* males. [s. l.], 2020.

PEREIRA-SANTOS, M. P.; YASUI, G. S.; XAVIER, P. L. P.; DE MACEDO ADAMOV, N. S.; DO NASCIMENTO, N. F.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 795–807, 2016.

PIVA, L. H.; SIQUEIRA-SILVA, D. H. De; GOMES, C. A. G.; FUJIMOTO, T.; SAITO, T.; DRAGONE, L. V.; SENHORINI, J. A.; PORTO-FORESTI, F.; FERRAZ, J. B. S.; YASUI, G. S. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? **Theriogenology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.013>>

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.

SAITO, T.; PS̃ENIC̃KA, M.; GOTO, R.; ADACHI, S.; INOUE, K.; ARAI, K.; YAMAHA, E. The Origin and Migration of Primordial Germ Cells in Sturgeons. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, 2014.

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.

SILVA, R. C.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; PAES, M. do C. F.; VALENTIN, F. N.; FUJIMOTO, T.; NASCIMENTO, N. F. Do; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. The effect of temperature on the initial development of Brycon amazonicus Spix & Agassiz, 1829 as tool for micromanipulation of embryos. **Zygote**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 1–15, 2017.

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.

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. YASUI, G. S.; SATIKO, L.; NAKAGHI, O.; SÉRGIO, P.; FERREIRA, N.; PEREIRA, M.; AUGUSTO, C.; GOES, G.; JOSÉ, F. P.; SENHORINI, A. Triploidization in the streaked prochilod *Prochilodus lineatus* inferred by flow cytometry, blood smears and karyological approaches. **Journal of Applied Ichthyology**, [s. l.], n. September 2019, p. 1–6, 2020.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **The Animal Consortium**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 464–470, 2014.

YOSHIZAKI, G.; TAGO, Y.; TAKEUCHI, Y.; SAWATARI, E.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, T. Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. **Biology of reproduction**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 88–93, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.104.034249>>

## 6. CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DE GENES MARCADORES EM CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS

### Resumo

Bioteχνologias envolvendo micromanipulação de células e embriões de peixes, como o transplante de células germinativas, permitem a construção de bancos genéticos e a investigação de processos complexos de desenvolvimento e diferenciação de células germinativas. A eficiência do transplante de PGCs depende da correta migração das células doadas do local de transplante para a região da formação da crista gonadal, no entanto, os mecanismos de reconhecimento e migração celular podem ser afetados nas etapas de micromanipulação. Células utilizadas nos procedimentos de micromanipulação devem manter as características de sua linhagem original, sendo muitas vezes necessárias adaptações nas metodologias, de acordo com a espécie utilizada. O objetivo deste capítulo foi avaliar a expressão gênica de diferentes genes relacionados ao desenvolvimento, manutenção e migração de PGCs. Para isso, foram utilizadas amostras de PGCs de *Astyanax altiparanae* cultivadas em solução salina (Holtfreter) e meio de cultivo celular (DMEM suplementado), para a avaliação da expressão relativa dos genes *buckyball*, *cxcr4b*, *cyclin B1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos*. 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. Os resultados da expressão gênica relativa demonstraram diferenças nas expressões entre as amostras de PGCs oriundas dos diferentes tipos de cultivo, com tendência ao aumento da expressão em PGCs cultivadas em meio suplementado, exceto para os genes *cxcr4b* e *nanos* que demonstraram diminuição da expressão. Os resultados da expressão gênica em PGCs isoladas são os primeiros relatos em espécies nativas e indicam que a suplementação do meio de cultivo otimiza o cultivo de PGCs e eficácia pós-transplante. Além disso, os dados indicam que as células isoladas para transplantes apresentavam a o nível de expressão dos genes característicos de PGCs, indicando a identidade das células transplantadas. Apesar de ser evidenciada a expressão em genes característicos de PGCs envolvidos nos processos de diferenciação, manutenção e migração de PGCs, o nível de expressão pode ainda não ser o mesmo daquelas PGCs no ambiente natural dos embriões, e o período de cultivo, bem como o meio, pode alterar o nível de expressão de genes importantes e conduzir a migração ectópica.

## **6.1. Material e Métodos**

Os procedimentos e análises experimentais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Peixes – Pirassununga-SP do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (ICMBio/CEPTA) em consonância com o comitê de ética para o uso de animais de laboratório do ICMBio/CEPTA (CEUA/CEPTA n° 02031.000033/2015-11) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ n° 4534110820).

### **6.1.1. Coleta de células germinativas primordiais cultivadas em diferentes condições para avaliação da expressão genica**

Os procedimentos gerais de coleta de gametas de *Astyanax altiparenae*, fertilização e obtenção de embriões foram realizadas como descrito no Capítulo I e II. Após a fertilização, uma alíquota de ovos foi imediatamente utilizada para as etapas de microinjeção e coleta para expressão gênica.

Para avaliação da expressão gênica das PGCs isoladas em diferentes condições de cultivos, como sucedido no transplante, foram utilizadas pool de PGCs referentes a 14 desovas, na qual as PGCs foram cultivadas em meio salino: Holtfreter contendo 0.01% penicilina e 0.01% estreptomicina, cultivados em incubadoras de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D); e um pool PGCs referentes a 8 desovas, em que as PGCs foram cultivadas em meio suplementado: 50% de solução de Holtfreter e 50% de meio de cultivo celular

constituído por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medim – high glucose, SIGMA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO), 1X de solução de aminoácidos não essenciais MEM (MEM Non – Essential Amino Acid Solution- 100X, SIGMA), 1X de solução de MEM-vitâmicas (MEM Vitamins Solution – 100X, SIGMA), 1X de solução de glutamina (L – Glutamax 100X, SIGMA), 1X de solução de antibiótico e antimicótico (Antibiotic Antymycotic Solution 100X, SIGMA ) e 1 mM de solução de piruvato (Sodium Pyruvate Solution – 100 mM, SIGMA), cultivados a 30°C em incubadora de CO<sub>2</sub>, com 100% de umidade.

Para coleta dessas células uma alíquota de ovos recém fertilizados de *A. altiparanae* foram decorionados usando solução de Holtfreter (59,2 mM NaCl, 0,67 mM KCl, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub> e 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>) acrescidas de 0,05% de pronase e transferidos para placas de Petri cobertas com ágar e preenchidas com solução de Holtfreter. A solução de mRNA da fusão GFP-*nanos1* 3'UTR (~10 nl) foi microinjetada no blastodisco no estágio de uma célula para posterior identificação de PGCs. Os embriões foram acompanhados até atingirem o estágio de blástula e neste momento foram dissociados em solução de citrato de sódio a 0,25%, como descrito no capítulo II.

As células dissociadas foram cultivadas em meio salino e meio suplementado, até a fase de segmentação contendo de 3 a 10 somitos, com aproximadamente 7 horas pós-fertilização, sendo o desenvolvimento embrionário acompanhado pelo grupo controle não injetado. Nesta fase do desenvolvimento as PGCs positivas para GFP tornaram se mais evidenciadas, e então foram selecionadas, coletas e armazenadas em Trizol a -80°C para

serem utilizadas nas etapas de extração de RNA total, síntese de cDNA e análise da expressão gênica relativa.

### 6.1.2. Distribuição dos genes alvo em tecido

Para triagem dos genes avaliados nas PGCs cultivados em diferentes condições de cultivo em tecidos, como músculo, cérebro, rim, fígado e gônadas, coletados de um único macho, exceto a amostra de ovário que veio de uma única fêmea, ambos adultos da espécie *A. altiparanae*. Para coleta dos tecidos os espécimes foram eutanasiados por overdose de anestésico óleo de cravo-da-índia (Biodinâmica, Pinhais, Paraná, Brasil) e as amostra foram armazenadas em Trizol a -80°C para posterior extração de RNA total.

### 6.1.3. Desenho dos primers

A sequência do gene *ubiquitina*, *cxcr4b*, *cyclinb1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos1* foram desenhadas a partir do alinhamento de sequencias de cDNA, oriundas de diferentes espécies de peixes, depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências dos cDNAs de *ubiquitina*, *ddx4*, *dazl*, *cyclin B1*, *nanos* de *Astyanax mexicanus*, *cxcr4b*, *buckyball* de *Danio rerio* e *dnd1* de *Pseudopimelodus mangurus* foram utilizadas para busca de sequências de maior identidade, usando o programa Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), sendo selecionadas preferencialmente aquelas da ordem Characidae e depois de outras ordens, como Siluriforme e

Cypriniforme. As regiões codificantes foram obtidas usando o programa Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) e alinhadas usando o programa Multalign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). As regiões conservadas para *ubiquitina*, *cxcr4b*, *cyclinb1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos* foram usadas prioritariamente para desenhar primers específicos usando o programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), tendo como referência o cDNA de *A. mexicanus*. Quando não era possível desenhar primers específicos nas regiões conservadas outras regiões foram utilizadas. As sequências dos primers são mostradas na Tabela 1. Os produtos da reação de PCR foram clonados no vetor pGEM e enviados para sequenciamento para comprovar a identidade dos genes.

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

GENE	SEQUÊNCIA DE PRIMER	TAMANHO DO AMPLICON (PB)
<i>ubiquitin</i>	FORWARD: 5' – AGATTACCCCTTCAAACCGC -3' REVERSE: 5' – GTCAGTCTTGTAGATGCGGG -3'	217
<i>buckyball</i>	FORWARD: 5' – TGGACAGTATGGCTTCCCAG-3' REVERSE: 5' – TGTACGCTCATTTGCTGGAA -3'	201
<i>cxcr4b</i>	FORWARD: 5' – ATTATCTTCCTCCTGGGCGTG-3' REVERSE: 5' – TTCGGCAAGTTCCTGTGCG-3'	190
<i>cyclin B1</i>	FORWARD: 5' – GCCTATGGAAACCTCTGGCT -3' REVERSE: 5' – TGCAGAGCATGGGATTGTCTG -3'	113
<i>dazl</i>	FORWARD: 5' – TGCGGTGAAGGAGGTCAAAA-3' REVERSE: 5' – GCGGAGTTCTCGTTCTCTCC-3'	179
<i>ddx4</i>	FORWARD: 5' – AAGACCACAGGAACTGAGCG-3' REVERSE: 5' – CCCGGTCTCCATGAATGCTT-3'	118
<i>dnd1</i>	FORWARD: 5' – GGCTGTGAGGTGTTTATCAGTC-3' REVERSE: 5' – TCCGCCTCATGATGAACTTCA-3'	101
<i>nanos1</i>	FORWARD: 5' – CTCTAGCGGAGTTTCCACCT -3' REVERSE: 5' – GTTGGTGGTTCCAGAAAACG -3'	191

#### **6.1.4. Extração de RNA e síntese de cDNA**

Para a análise da expressão relativa dos genes *ubiquitina*, *cxcr4b*, *cyclin B1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos*. O RNA foi extraído de pool de células germinativas primordiais isoladas e cultivadas em meio salino e pool de células germinativas primordiais isoladas e cultivadas em meio suplementado de *A. altiparanae* usando Trizol (Ambion® # 15596026, Carlsbad, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA quantificando em espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em seguida o RNA foi tratado com DNase1 e a síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen # 18080-051, Carlsbad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **6.1.5. Análise da expressão gênica**

##### **6.1.5.1. PCR convencional**

A especificidade dos primers desenhados foram avaliadas inicialmente utilizando a PCR convencional utilizando apenas amostra de oócitos, posteriormente foram feitas avaliações da expressão dos primers em relação as amostras do desenvolvimento embrionário e tecidos. As reações foram padronizadas nas seguintes condições: 3 µL de 10x PCR Rxn Buffer, 0,6 µL de dNTPs a 10 mM, 0,9 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 1,5 µL de mistura de primers a 10

mM, 1  $\mu$ L cDNA, 0,3  $\mu$ L de Taq DNA polimerase na concentração de 5 U/ $\mu$ L e 22,7  $\mu$ L de água livre de nucleases, sendo a reação com volume final de 30  $\mu$ L. A ciclagem foi padronizada em: 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s e incubação final de 72°C por 10 min. O produto das amplificações foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 3% (2,10 g agarose / 70 mL tampão TBE 0,5x), corado com 0,5  $\mu$ L SYBR Safe DNA Gel Stain para cada 10 mL de solução de agarose. Para cada 10  $\mu$ L de produto amplificado foram adicionados 1  $\mu$ L de tampão de carregamento e em seguida foram aplicados no gel. Para uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA, foi aplicado em um dos poços o Ladder 1 Kb plus DNA na concentração de 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L (Invitrogen) como marcador de massa molecular. A eletroforese foi realizada a 90 Volts em tampão TBE 0,5x e o gel foi visualizado utilizando transiluminador (Accuris, China) e fotografado em sistema de foto documentação ENDURO GDS (Labnet International, China).

#### **6.1.5.2. PCR em Tempo Real**

As análises da quantificação relativa da expressão gênica foram conduzidas por meio de PCR em tempo real. Inicialmente foram realizadas avaliações para obtenção de primer endógeno que não apresentasse diferenças de Ct e exibisse curva dentro do ideal para as amostras avaliadas. Foram testados,  *$\beta$ -actina*, *rRNA18s*, *hgprt*, *ef1a*, *ppia*, *gapdh*, *rplp0* e *ubiquitin*, na qual o gene *ubiquitin* apresentou menores variações entre as amostras e curva dentro

do limite ideal, sendo o escolhido como gene endógeno nas reações de quantificação relativa.

A construção das curvas padrões para os genes de interesse *cxcr4b*, *cyclinb1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos* e controle endógeno *ubiquitina* foram realizadas utilizando diluição seriada 1:3, sendo o primeiro ponto da curva não diluído de cDNA de oócito ou blástula guiados pelos resultados da PCR convencional. As curvas foram feitas juntas e em duplicata para cada ponto. Foram consideradas as curvas com eficiência entre 0,9 e 1,1 e  $R \cong$  de 0,99.

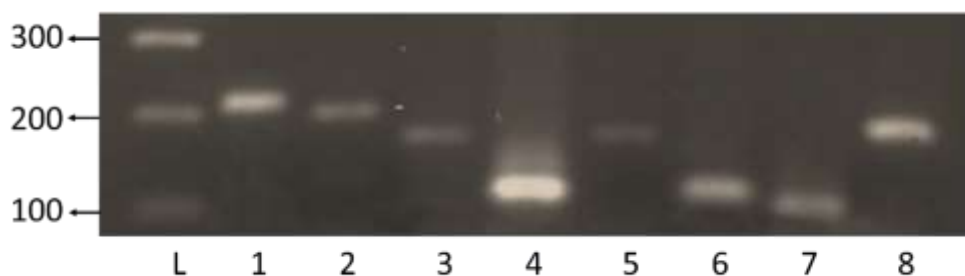
A expressão relativa dos genes com curvas padrão estabelecidas foi avaliada por PCR em tempo real para as amostras provenientes de cDNA de células germinativas primordiais cultivadas em meio salino e suplementado, diluídos na proporção de 1:3. Foi utilizando um controle negativo da reação (NTC) para cada gene. Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas. Para cada reação foi usado: 10  $\mu$ L de QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 8  $\mu$ L de água livre de nucleases, 1  $\mu$ L da mistura de *primers* para os genes alvo e 1  $\mu$ L de cDNA diluído 1:5. As condições de amplificações foram: Hold 95°C por 2 min, seguidas de 40 ciclos de 95°C por 5 seg e 63°C por 15 seg, com curva de Melt entre 55°C e 95°C em termociclador RotorGene Q (Quiagem Hilden, Germany). As análises da quantificação relativa da expressão genica foram conduzidas baseada no método de curva padrão (LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005). A quantificação dos transcritos de cada um dos genes de interesse foi calculada a partir da diferença dos valores de C<sub>q</sub> (threshold PCR cycle) em relação aos transcritos do gene endógeno/calibrador, *ubiquitin*, sendo que estes valores foram utilizados para a quantificação relativa da expressão gênica, nas amostras de PGCs, utilizando PGC do meio salino como

normalizador. Para auxiliar na interpretação dos resultados, o padrão da abundância relativa de RNA de cada gene alvo nas PGCs do meio suplementado foi analisado em relação à abundância nas PGCs do meio salino, sendo que a abundância deste último recebeu o valor nominal de 1.

## 6.2. Resultados

Nas análises de especificidade dos primers *ubiquitin*, *buckyball*, *cxcr4b*, *cyclin B1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos* para o cDNA dos oócitos de *Astyanax altiparanae* foram observadas apenas uma banda de amplificação em cada reação (Fig. 1). Os produtos de amplificação foram sequenciados, as sequencias obtidas foram alinhadas e comprovado a identidade das sequencias com percentual de 98 a 100% entre *A. altiparanae* e *A. mexicanus* (Fig. 2). Para o primer endógeno *ubiquitin* foi realizado análise de PCR convencional nas amostras de oócito, PGCs – meio salino e PGCs meio suplementado, evidenciando uma expressão similar deste gene endógeno nas amostras a serem avaliadas por qPCR (Fig. 3).

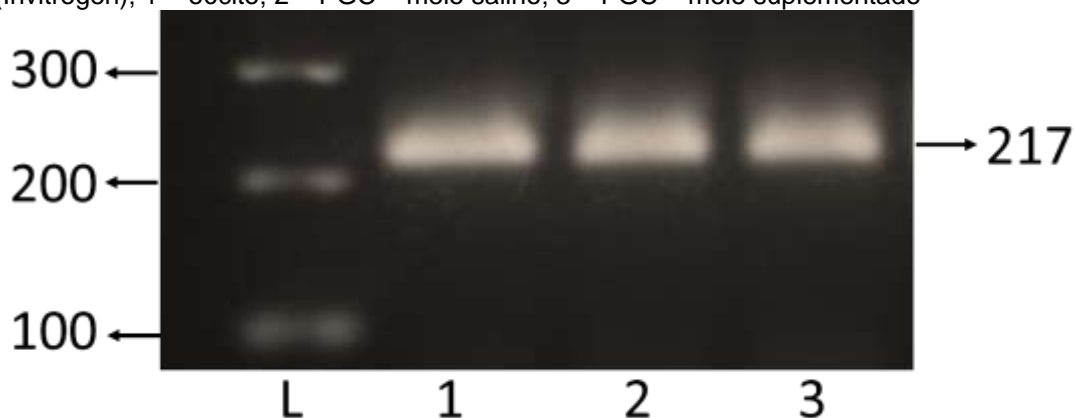
**Figura 1:** Gel de agarose a 2% na avaliação dos primers desenhados em amostra de cDNA de oócito de *Astyanax altiparanae*. L – Ladder 1 kb plus (Invitrogen); 1 - *ubiquitin*; 2 - *buckyball*; 3 - *cxcr4b*; 4 - *cyclin B1*; 5 - *dazl*; 6 - *ddx4*; 7 - *dnd1*; 8 - *nanos*.



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

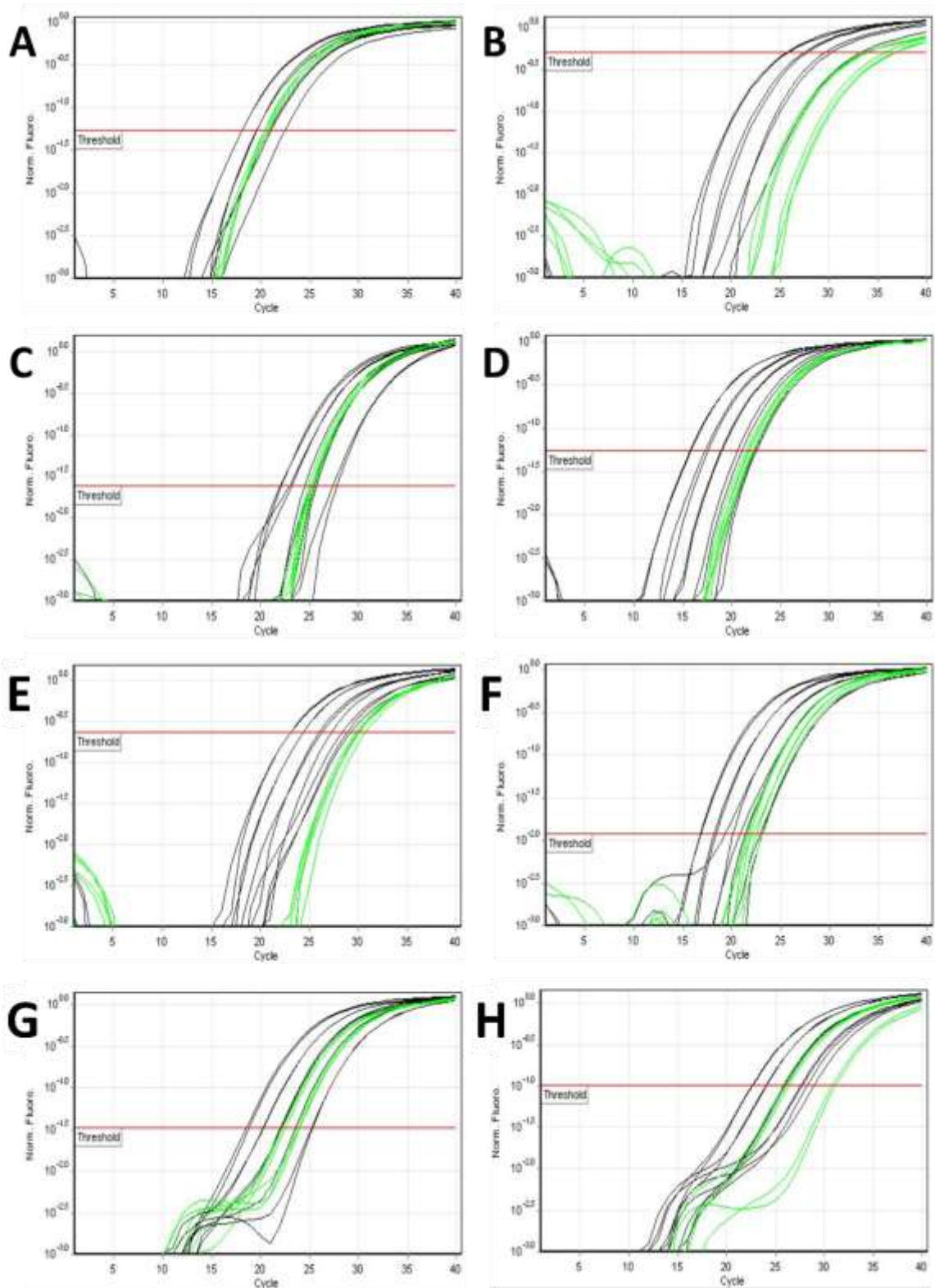


**Figura 3:** Gel de 2% na análise de PCR da expressão gênica utilizando cDNA de oócito e células germinativas primordiais em diferentes condições de cultivo de *Astyanax altiparanae*. L – Ladder 1 kb plus (Invitrogen); 1 – oócito; 2 – PGC – meio salino; 3 – PGC – meio suplementado

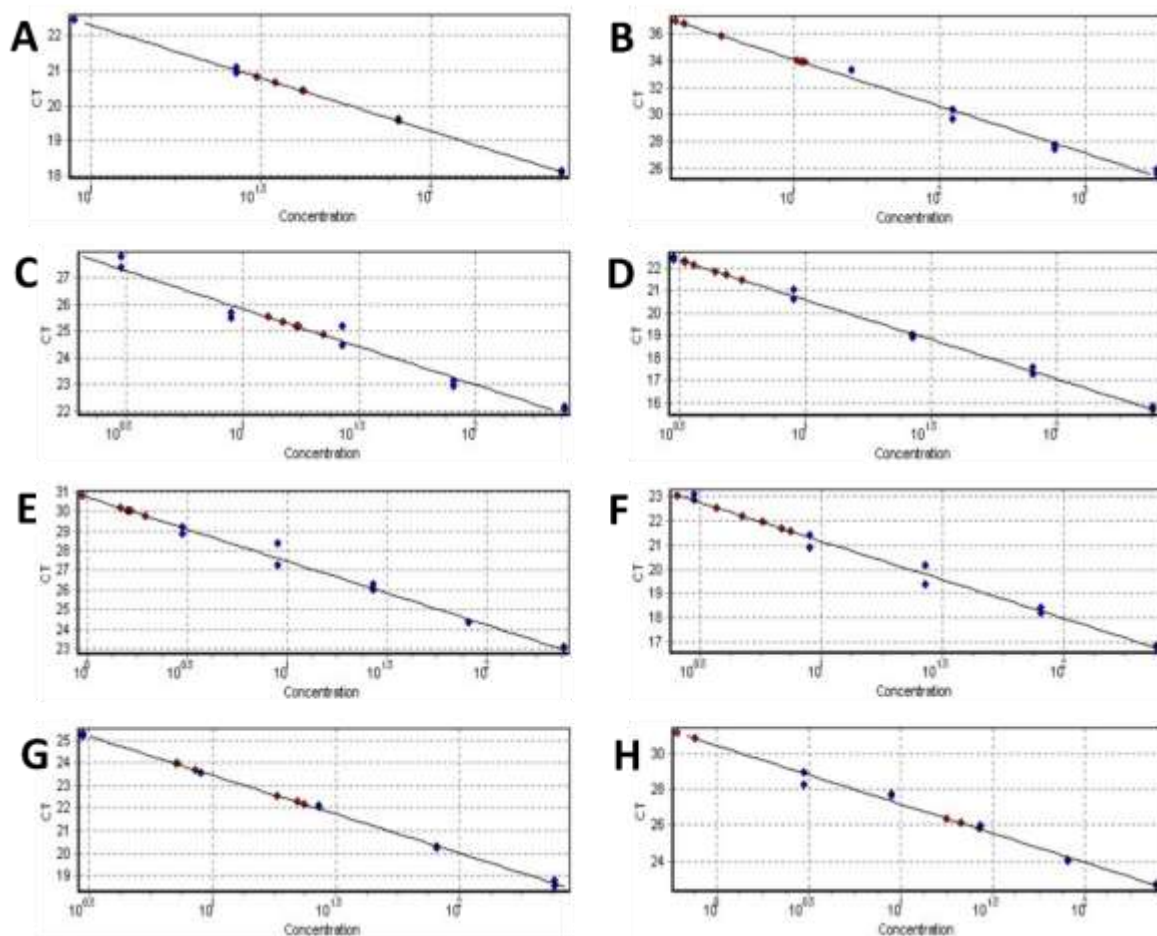


Os produtos de amplificação gerados no final da PCR demonstraram que não houveram amplificações inespecíficas, porém em alguns casos pode ser observado a presença de dimerização dos primers. A partir dos dados iniciais de PCR convencional, foram feitas as curvas padrão da qPCR para os genes *ubiquitin*, *cxcr4b*, *cyclin B1*, *dazl*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos* (Fig. 4), para análises das expressões relativas dos genes de interesse em PCR em tempo real. As curvas padrão apresentaram eficiências das amplificações dos genes de interesse e do controle endógeno variando de 0,87 a 1,3 e os pontos amostrais foram observados dentro dos limites das curvas, com exceção de *buckyball*, *dazl* e *nanos* (para PGC de meio suplementado) (Fig. 5).

**Figura 4:** Gráfico das ampliações 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*.

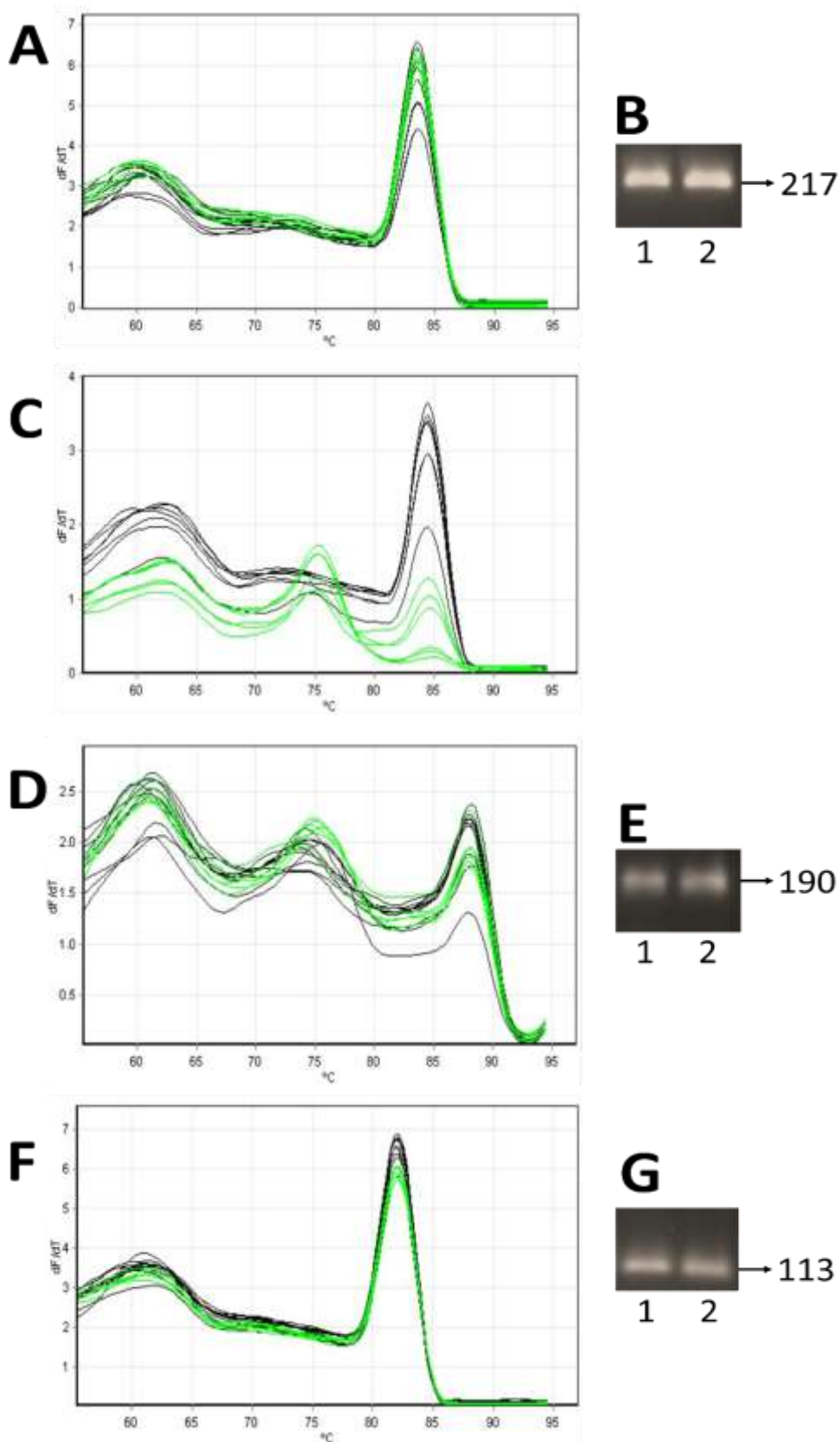


**Figura 5:** Curva Padrão de *Astyanax altiparanae* para os genes **A** – *ubiquitin*; **B** – *buckyball*; **C** – *cxcr4b*; **D** – *cyclin B1*; **E** – *dazl*; **F** – *ddx4*; **G** – *dnd1*; **H** – *nanos*.

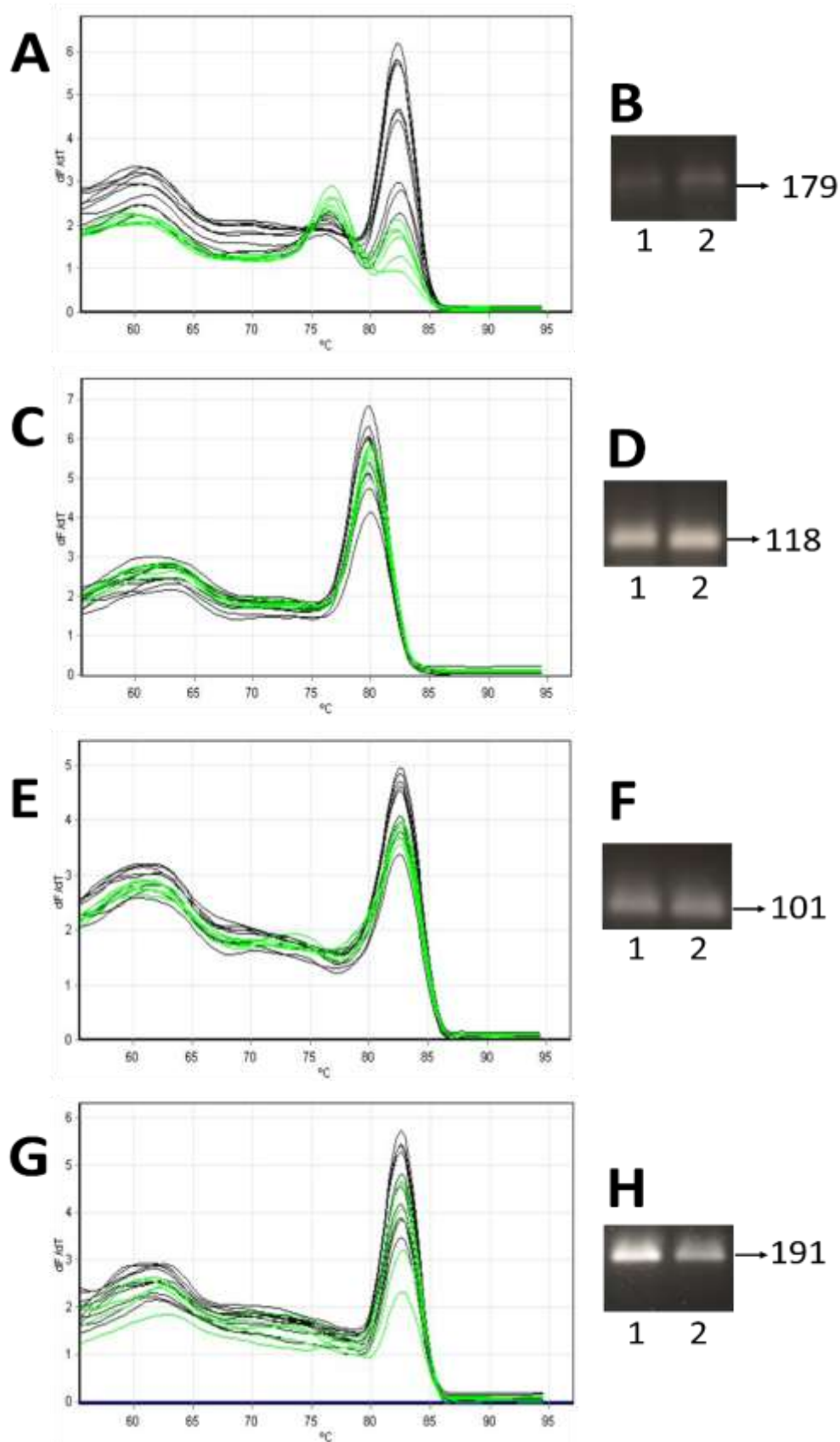


Os dados das curvas de melting para os produtos das amplificações dos genes de interesse evidenciaram a formação de um pico principal em temperatura específica para *ubiquitin*, *cyclin B1*, *ddx4*, *dnd1* e *nanos* (Fig. 6 e 7), entretanto, pode ser verificada a formação de dímeros nas amplificações de *buckyball*, *cxcr4b* e *dazl* em baixas concentrações de cDNA (Fig 6b e c; e 7a). Para estas reações foram testadas diferentes condições de reação, variando-se temperaturas, diluições de cDNA e concentrações de primers, na tentativa de evitar a ocorrência de dímeros, sendo apresentada aqui as condições já otimizadas. As amostras do PCR em tempo real foram visualizadas em gel de agarose a 2% (Fig 6 e 7), exceto pra *buckyball* que não apresentou expressão para as amostras de PGC.

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



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



Na análise de qPCR, nas condições de diluição, não foram obtidos os níveis de expressões do gene *buckyball* nas amostras de PGCs oriundas do meio salino e suplementado, portanto, não foi possível continuar as análises para estes genes.

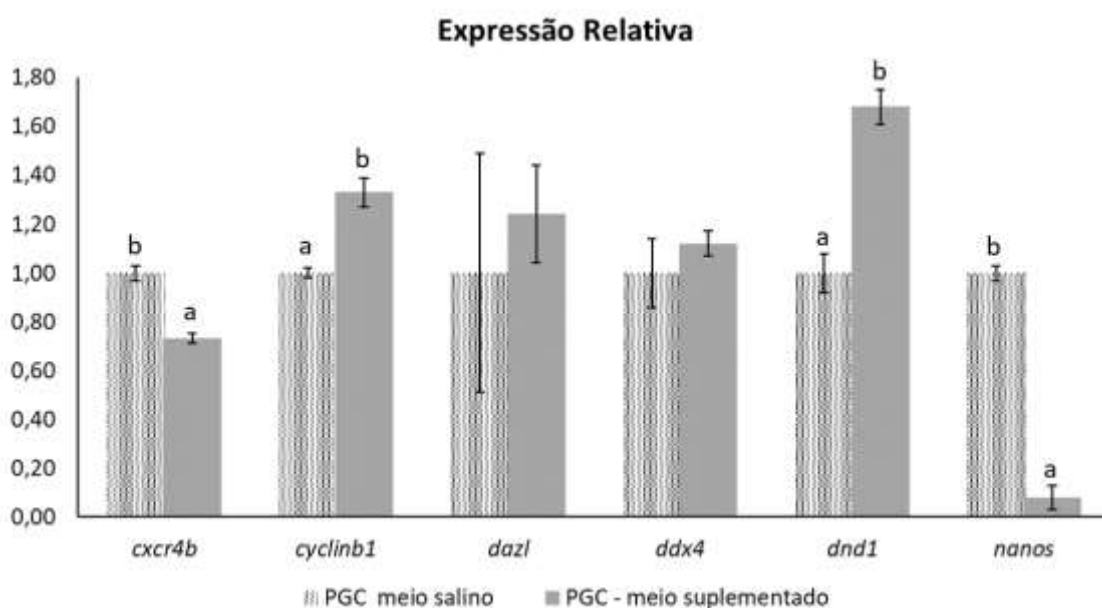
Os resultados da expressão gênica relativa demonstram diferenças nos níveis de expressões dos genes avaliados entre as diferentes amostras (Fig. 8). Foi observada um aumento do nível de expressão dos genes *cyclin B1*, *dnd1*, *dazl* e *ddx4* em PGCs cultivadas em meio suplementado, enquanto os níveis de expressão dos genes *cxcr4b* e *nanos* apresentaram diminuição (Fig. 8). Os genes *dazl* e *ddx4* não apresentaram diferenças significativas.

O maior aumento do nível de expressão gênica foi observado para o gene *dnd1*, cerca de 68% maior em PGC em meio suplementado que no salino. *Cyclin B1* teve um aumento de cerca de 33% maior em PGCs oriundas do meio suplementado em relação as PGCs do meio salino. Apesar de não ter sido verificada diferença significativa, o gene *dazl* apresentou na média cerca de 24% de aumento de expressão no meio suplementado, enquanto *ddx4* apresentou cerca de 12% de aumento de expressão em relação ao meio salino. Estes resultados indicam uma tendência no aumento da expressão gênica nas PGCs dos genes avaliados no meio suplementado em relação ao meio salino (Fig. 8).

Diferentemente da tendência do aumento do nível de expressão gênica nos genes avaliados para o meio suplementado, os genes *cxcr4b* e *nanos* apresentaram diminuição da expressão em PGCs vindas do meio suplementado em relação a PCGs do meio salino. Para *cxcr4b* foi observada diminuição em torno de 23% na expressão gênica no meio suplementado em relação ao salino, enquanto que para *nanos* a queda foi drástica, sendo em torno de 92%. (Fig. 8).

Apesar dos diversos testes para melhorar as condições de reação em *cxcr4b* e *dazl*, ainda pode ser verificada a formação de dímeros nas amplificações, podendo ter então interferências nas análises de ambos os genes (Fig. 6 D e 7 A, respectivamente.)

**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.

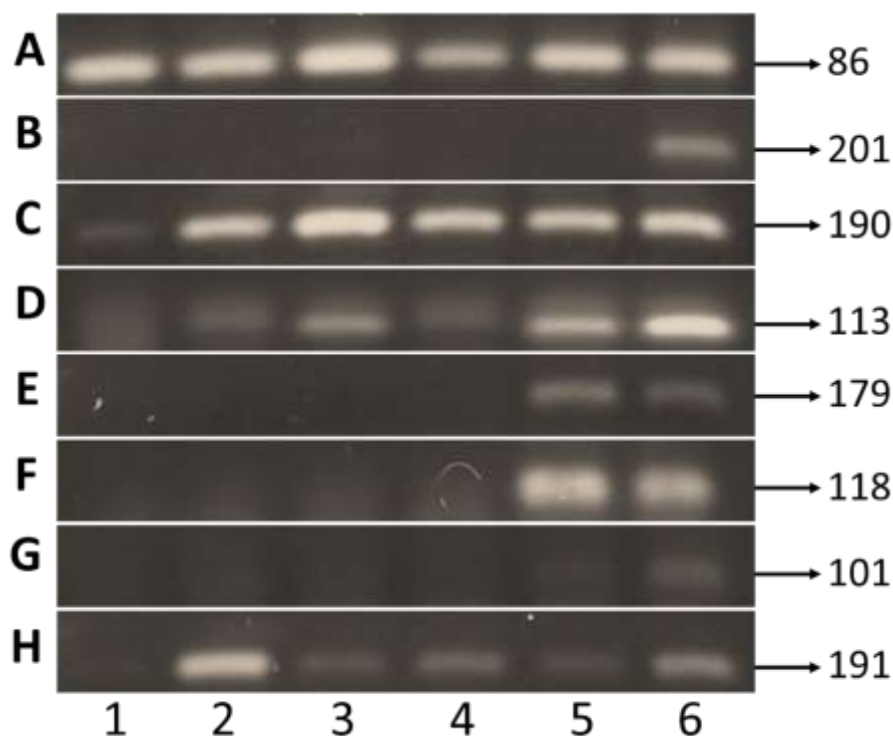


### 6.2.1. Expressão dos genes alvo em tecidos

Em *A. altiparanae* adulto *cxcr4b*, *cyclin B1* e *nanos* (Fig. 9 C, D e H) foram expressos em uma ampla gama de tecidos, incluindo, cérebro, rim, fígado e gônadas, em músculo foi observado apenas a expressão de *cxcr4b* e *cyclin B1* (Fig. 9 C e D). *Buckyball* foi expresso exclusivamente em ovário (Fig. 9 B), enquanto *dazl* e *ddx4* são específicos para gônadas masculina e feminina (Fig.

9 E e F). *Dnd1* apresentou fraca expressão nas gônadas masculina e feminina (Fig. 9 G).

**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*, 1 – Musculo; 2 – Cérebro; 3 – Rim; 4 – Fígado; 5 – Testículo; 6 – Ovário



### 6.3. Discussão

As células germinativas primordiais são diferenciadas no início do desenvolvimento e migram do local de origem até os primórdios gonadais (GRIMALDI; RAZ, 2019; RAZ, 2003; YAMAHA et al., 2007). O desenvolvimento das gônadas, assim como o sucesso do transplante, depende da manutenção e correta migração das PGCs, sendo estes processos dependentes das ações de diversos genes PGC-específicos (BARTON; LEBLANC; LEHMANN, 2016; DOITSIDOU et al., 2002; GRIMALDI; RAZ, 2019; GROSS-THEBING et al., 2017;

SAITO et al., 2010; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2010). Os baixos níveis de expressão desses genes podem levar a apoptose de células germinativas ou a migração ectópica (BARTON; LEBLANC; LEHMANN, 2016; DOITSIDOU et al., 2002; GROSS-THEBING et al., 2017; KNAUT et al., 2003).

Diversos trabalhos de transplante de células germinativas primordiais relatam a migração ectópica dessas células (KAWAKAMI et al., 2010; SAITO et al., 2008, 2010, 2011; TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2003; YASUI et al., 2011), em nosso estudo de transplante descrito no capítulo II foi possível observar grande proporção de células com migração errônea. Entretanto, após as PGCs serem cultivadas em meio suplementado alcançamos a migraram para região da crista gonadal em 4,5% dos receptores triploides e 19,3% em receptores híbridos triploides, indicando que a suplementação do meio de cultivo otimiza o cultivo de PGCs e eficácia pós-transplante. Diante disso, avaliamos alguns genes relacionados a especificação e migração de PGC e, portanto, os resultados indicam que as células selecionadas para o transplante são realmente PGCs e apresentaram melhores condições e aumento expressão gênica quando cultivadas em meio suplementado em relação ao salino.

O gene *cxcr4b* é expresso em PGCs durante a migração, fazendo com que as PGCs sejam atraídas e direcionadas ao ligante do *cxcr4b*, a quimocina *sdf-1* (fator derivado de estroma), que é secretada pelas células somáticas de áreas extragonadais para as regiões de formação das gônadas. O eixo *sdf-1/cxcr4b* é relatado como o principal regulador de orientação guiada de células germinativas (BARTON; LEBLANC; LEHMANN, 2016; DOITSIDOU et al., 2002; KNAUT et al., 2003; OKUTSU et al., 2006; RAZ, 2003).

Diversos trabalhos demonstram que a migração e orientação das PGCs exigem *sdf-1* nos tecidos somáticos e *cxcr4b* nas PGC (DOITSIDOU et al., 2002; HERPIN et al., 2008; KNAUT et al., 2003; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2010; SASADO et al., 2008). O nível de expressão de *cxcr4b* diminuiu em PGCs cultivadas em meio suplementado, no entanto, *cxcr4b* não é necessário para sobrevivência das PGCs, porém é fundamental para guiar a migração. O nível reduzido de *cxcr4b* pode manter o comportamento móvel das células, entretanto, podem atingir locais ectópicos no embrião devido a migração não direcionada (DOITSIDOU et al., 2002; RAZ, 2003; RAZ; REICHMAN-FRIED, 2006), o que pode estar relacionado ainda com o aumento de migrações ectópicas observada nos transplantes realizados neste trabalho. No entanto, mesmo com a redução da expressão em PGCs cultivadas em meio suplementado, os níveis de *cxcr4b* nestas células ainda permitiram que ocorresse a migração. Este fato pode indicar que outros fatores podem estar envolvidos na migração e devem ter sido favorecidos com o cultivo no meio suplementado, como o aumento da expressão de *dnd1*, *ddx4* e *dazl*, genes também responsáveis pela migração de PGCs. Esta hipótese pode ser reforçada pelo fato de que mesmo com maiores níveis de *cxcr4b* nas células cultivadas em solução salina e menores níveis de *dnd1*, *ddx4* e *dazl*, as migrações observadas foram todas ectópicas.

Além disso, *cxcr4b* foi expresso em uma ampla gama de tecidos, o que indica função múltipla para esse gene na espécie em estudo. O eixo SDF-1/CXCR4 apresenta forte influência na migração celular, sendo necessário para migração de células neurais, células hemato, células tronco e expresso durante a organogênese e em células tumorais (KUCIA et al., 2004).

Com função conservada na diferenciação, proliferação e migração de PGCs para o local de origem até os primórdios gonadais, os genes *dazl*, *ddx4* e *dnd1* herdados maternalmente, apresentam aumento da expressão em PGCs cultivadas em meio suplementado em relação aquelas do meio salino podendo ser um fator importante para a migração direcionada e manutenção das PGCs. Nos tecidos de adultos, o nível de expressão destes genes foi observada específica em gônada, como relatado para outras espécies, tais como, *Epinephelus coioides* (QU et al., 2020), *Oreochromis niloticus* (BHAT; HONG, 2014; JIN; DAVIE; MIGAUD, 2019), *Oryzias latipes* (XU et al., 2007), *Danio rerio* (WEIDINGER et al., 2003), *Gadus morhua* L. (PRESSLAUER et al., 2012)

Esses genes desempenham papéis importantes no desenvolvimento de PGCs, sendo relatado que a diminuição e/ou depleção das expressões destes genes podem comprometer os processos de diferenciação e migração. A inibição da expressão de *dnd1* em *Danio rerio* em embriões não afetou a diferenciação de PGCs, no entanto, após a especificação foi observada grave aumento dessas células com migração ectópica. No estudo realizado por Gross-Thebing et al., (2017), as PGCs que apresentaram migração ectópica, na ausência de *dnd1*, apresentaram morfologia similar a células musculares e neurais. O knockout de *dnd1* também resultou na diminuição do nível de expressão dos principais marcadores de células germinativas, como *vasa* (*ddx4*) e *nanos3* (GROSS-THEBING et al., 2017; KEDDE et al., 2007; WEIDINGER et al., 2003). PGCs que apresentaram migração ectópica, na ausência de expressão *cxcr4b*, mantiveram o nível expressão de *dnd1* não foi observada a alteração da morfologia e continuaram expressando *ddx4*. Esse estudo sugere

que PGCs com depleção de *dnd1* tornam-se pluripotentes, podendo dar origem as células de todas as camadas germinativas (GROSS-THEBING et al., 2017).

Estudo envolvendo mutações do gene *ddx4* em *Danio rerio* resultou em prole constituída apenas por macho estéreis (HARTUNG; FORBES; MARLOW, 2014). Em *Oryzias latipes* o knockout do gene *ddx4* não afetou a proliferação, sobrevivência e motilidade PGCs, no entanto, quando utilizadas no transplante não apresentaram migração adequada, indicando que a inibição de *ddx4* resultaria na perda da responsividade das PGCs ao sinal direcional de migração em direção a gônada (LI et al., 2009). Enquanto que o knockout do gene *dazl* reduziu significativamente o número de PGCs e em alguns casos, impediu completamente a formação de PGCs (LI et al., 2016).

Assim como os demais, o gene *nanos* é essencial para o desenvolvimento de PGCs. A ausência de *nanos* resulta na mitose prematura das PGCs, migração ectópica e perda de sua identidade (HASHIMOTO et al., 2010; KOPRUNNER et al., 2001). Neste estudo, o nível de expressão de *nanos* foi drasticamente reduzido em PGCs cultivadas em meio suplementado, quando comparado com PGCs provenientes de solução salina. Tem sido reportado em *Drosophila* que as proteínas *Nanos* e *Pumilio* estão envolvidos na ligação da região 3'UTR do mRNA de *cyclin B1* reprimindo a sua tradução. *Cyclin B1* é uma proteína ativa na fase mitótica e sua regulação é importante para que as PGCs não se proliferem anteriormente a migração (ASAOKA-TAGUCHI et al., 1999; HASHIMOTO et al., 2010; KADYROVA et al., 2007). Os resultados de expressão gênica obtidos das PGCs indicaram um baixo nível de mRNA de *nanos* e maior nível de *cyclin B1* em PGCs cultivadas em meio de cultivo suplementado em relação as PGCs cultivadas em solução salina. Os dados de divisão celular de

PGCs vindas dos experimentos de transplante de PGCs de lambari (Capítulo 2) sugerem que as PGCs da solução salina, que apresentaram maiores níveis de mRNA para *nanos* e menor para *cyclin B1*, apresentam menores taxas de divisão celular, variando de 1,3 a 5,5%. Enquanto que para as PGCs oriundas do meio de cultivo que apresentaram menor nível de expressão de *nanos* e maior expressão de *cyclin B1*, as taxas de divisão celular encontradas foram maiores que aquelas da solução salina, variando de 13,6 a 16,1%. Essas taxas de divisão celular e os níveis de mRNA de *nanos* e *cyclin B1* parecem estar relacionadas. Apesar de ser observada a queda na expressão de *nanos* e aumento da *cyclin B1*, bem como aumento da taxa de divisão de PGCs, as PGCs oriundas do meio de cultivo suplementado foram aquelas capazes de realizar a migração correta para crista gonadal, sugerindo que esta queda no nível de mRNA de *nanos* ainda permite a migração correta das PGCs. Em *Danio reio*, o knockout de *nanos1* não ocasionou defeitos na especificação de PGCs, embora tenha reduzido o número e a migração foi ectópica, apresentando redução de fluorescência (KOPRUNNER et al., 2001).

Em *Astyanax mexicanus* só tem sido reportada a sequência de *nanos1*, não sendo encontradas as isoformas de *nanos2* e *nanos3*. Os primers utilizados para a expressão de *nanos* de *Astyanax altiparanae* amplificou uma sequência que teve maior identidade com *nanos1* de *A. mexicanus*. Informações sobre as isoformas de *nanos* no gênero *Astyanax* não são conhecidas. A expressão de *nanos* em *Astyanax altiparanae* foi obtida em todos os tecidos avaliados, com exceção do músculo. A expressão de *nanos1* em diferentes tecidos também foi relatada para *Oreochromis niloticus*, descrevendo como potencial efeito pleiotrópico nos tecidos, além das gônadas (JIN; DAVIE; MIGAUD, 2019). Em

*Oryzias latipes* é relatada expressão no cérebro e nas células somáticas que circundam os oócitos e espermatócitos (AOKI et al., 2009). A falta de sequenciamento completo para espécies nativas pode dificultar no desenho de primers específicos, sendo necessário mais estudos e esclarecimentos a respeito desses genes para nossas espécies.

Nas amostras de PGCs cultivadas em meio salino e suplementado não foram obtidas as expressões de *buckyball*. Sabe-se que esse gene está envolvido na diferenciação de PGCs durante a migração e no desenvolvimento gonadal, sendo considerado importante para organização do plasma germinativo (BONTEMS et al., 2009; EWEN-CAMPEN; SCHWAGER; EXTAVOUR, 2010; YE et al., 2018). A expressão de *buckyball* foi exclusiva em ovários, assim como para a espécie *Acipenser dabryanus* (YE et al., 2018).

Os resultados da expressão gênica em PGCs isoladas, após a dissociação das blástulas e cultivo até a fase de somito, são os primeiros relatos para espécies nativas e representam um bom indicativo de que a suplementação do meio de cultivo proporcionou melhores condições para PGCs, além de confirmar a identidade das células isoladas para transplantes. Para conhecermos melhor o nível de expressão dos genes característicos, bastante discutidos na diferenciação e migração de PGCs, ainda faz se necessário o conhecimento dos níveis de mRNA em PGCs isoladas diretamente dos embriões na fase de 6 a 10 somitos, para obtermos um padrão do nível de expressão destes genes e compararmos com dados de expressão gênica oriundas de diferentes meios de cultivo. Esta ferramenta, aliada ao transplante de PGCs oriundas dos diferentes meios, pode auxiliar na eficiência na geração de quimeras germinativas e compreensão da relação do nível de expressão dos

genes relacionados as PGCs e suas funções de diferenciação, manutenção, migração e proliferação.

## 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.; BANDEMER, 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.

## APÊNDICE A - REMOÇÃO DE CÓRION

### REMOÇÃO ENZIMÁTICA DE CÓRION



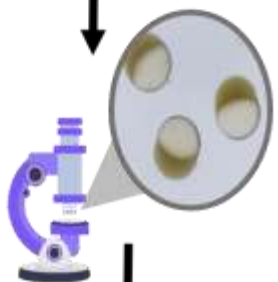
Reprodução de espécimes utilizadas no transplante



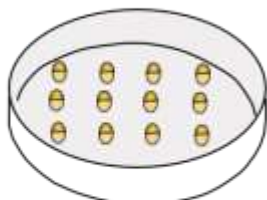
Alíquota de ovos recém fertilizados transferida para um placa de Petri



Adição de solução salina (Characin ou Holtfreter)\* acrescida com 0.05% de pronase. Agitar a placa com movimentos circulares constantemente, facilitando a ação enzimática



Remoção do córion observada em esteromicroscópio até atingir cerca de 80% de remoção.

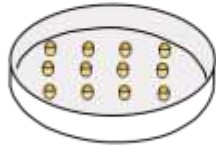


Ovos decorionados transferidos de forma alinhada (a fim de facilitar a microinjeção de mRNA) para placas de Petri revestidas com ágar 1%, preparadas em solução salina (Characin ou Holtfreter)\*, para proteção mecânica dos embriões. Os ovos ficam submersos em solução salina\*.

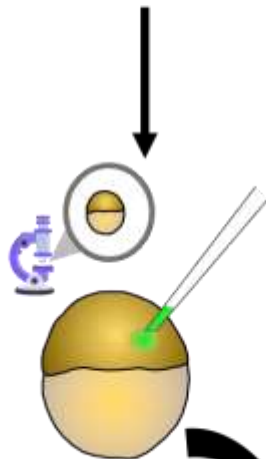
\* Solução salina: deve ser previamente testada na espécie utilizada, a fim de obter melhores taxas de eclosão e normalidade em embriões e larvas.

## APÊNDICE B - MICROINJEÇÃO DE mRNA

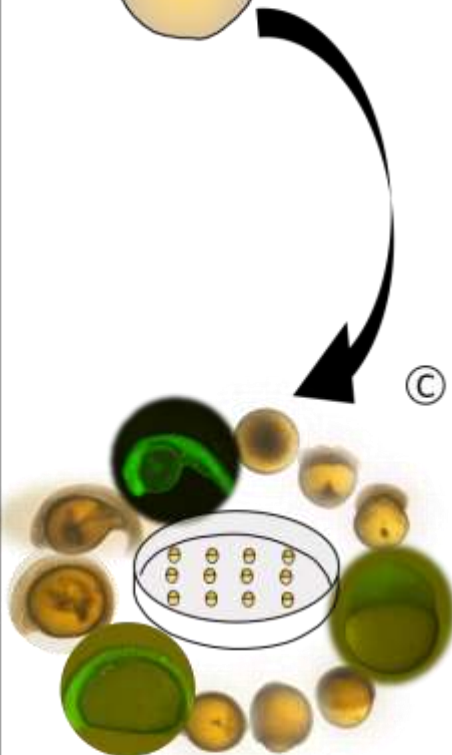
### MICROINJEÇÃO DE mRNA



- (A) Ovos recém fertilizados distribuídos de forma alinhada para microinjeção de mRNA.



- (B) Microinjeção de cerca de 10 nL de solução de mRNA (GFP-*nanos1* 3'UTR)\*\* em blastodisco de ovos decorionados, no estágio de uma célula, utilizando micropipeta de boro-silicato de 10  $\mu$ m de diâmetro, conectada a um micromanipulador e efetuada sob esteriomicroscópio.



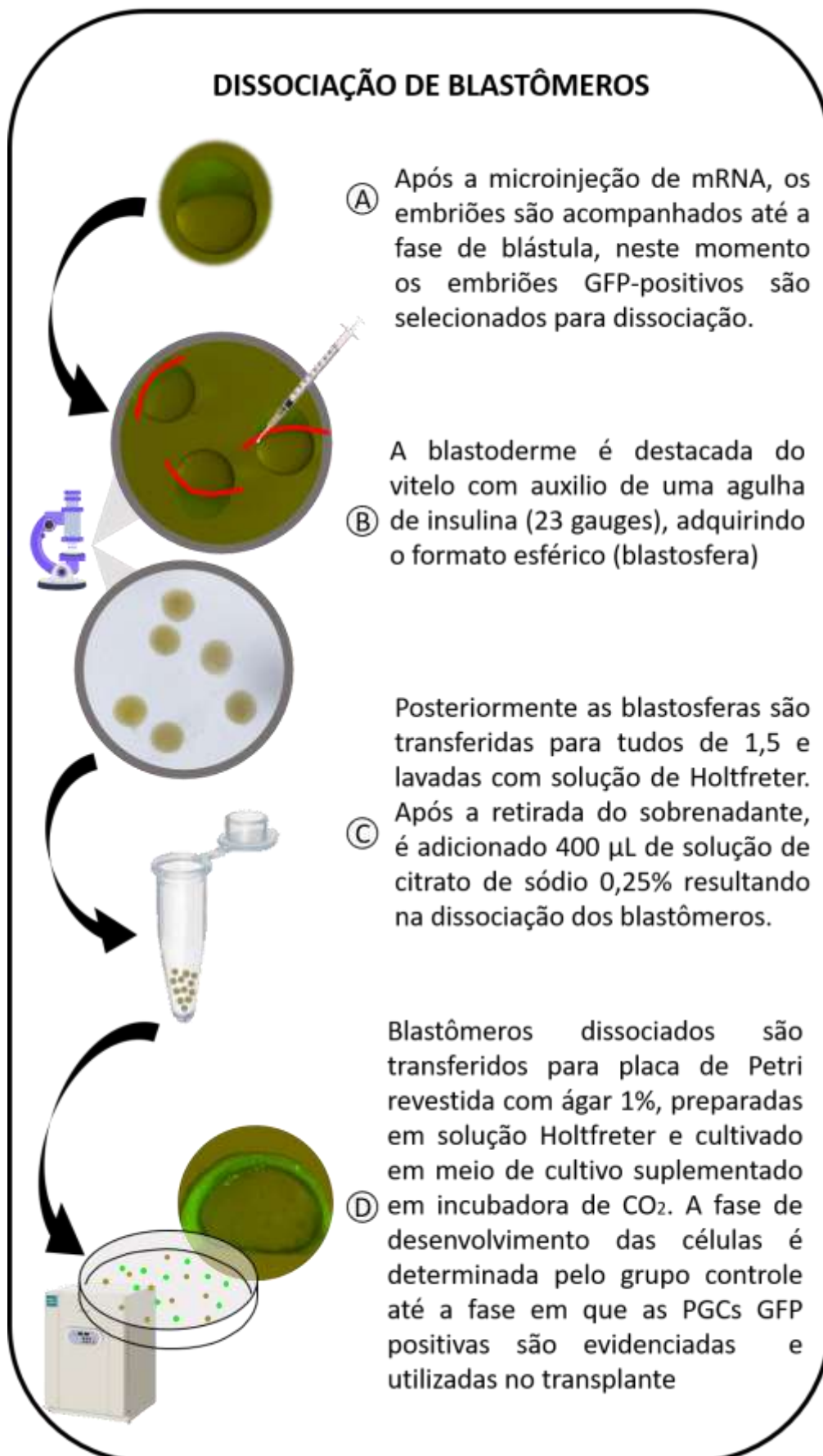
- (C) Após a microinjeção ovos são transferidos para uma nova placa de Petri revestida com ágar 1%, preparadas em solução salina (Characin ou Holtfreter)\*. Os ovos são mantidos submersos em solução salina, podendo ser acrescido com 0.01% penicilina e 0.01% estreptomicina, com trocas constantes de solução. O desenvolvimento embrionário é acompanhado até a fase de expressão de GFP (pode variar de acordo com a espécie e mRNA utilizado) ou até blástula, momento em que inicia as etapas de transplante.

\* Solução salina: deve ser previamente testada na espécie utilizada, a fim de obter melhores taxas de eclosão e normalidade em embriões e larvas.

\*\* O mRNA utilizado pode variar de acordo com o propósito do estudo e espécie utilizada.

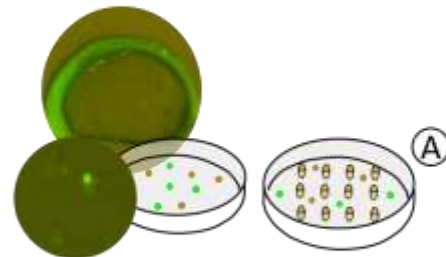
## APÊNDICE C - DISSOCIAÇÃO DE BLASTÔMEROS

### DISSOCIAÇÃO DE BLASTÔMEROS



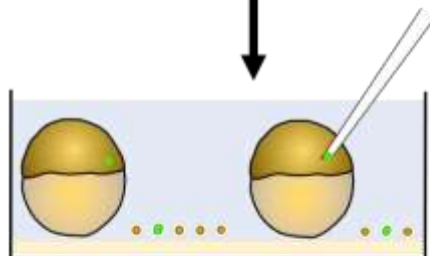
## APÊNDICE D - TRANSPLANTE DE PGCs

### TRANSPLANTE DE PGCs



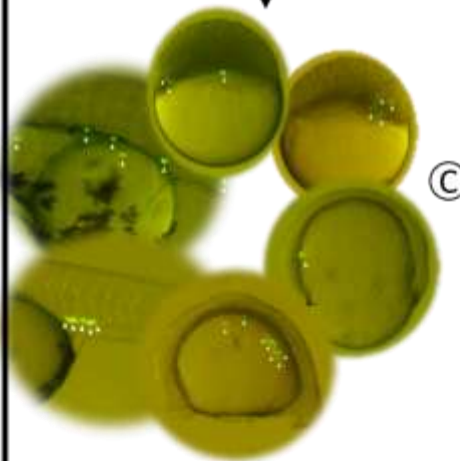
(A)

Após as PGCs GFP-positivas serem evidenciadas na placa de cultivo, é realizada a remoção do córion dos embriões receptores estéreis em fase de blástula e transferidos para mesma placa das PGCs cultivadas



(B)

1 a 3 PGC GFP-positivas são aspiradas usando micropipeta de boro-silicato de até 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro, conectada a um micromanipulador anexo ao esteriomicroscópio, e transplantadas para a região marginal lateral da blastoderme de embriões receptores estéreis.



(C)

Embriões transplantados são mantidos submersos em solução salina (Characin ou Holtfreter)\*, podendo ser acrescido de 0.01% penicilina e 0.01% de estreptomicina, com trocas constantes de solução em placa de Petri revestidas com ágar 1%, preparadas em solução salina, para proteção mecânica dos embriões. O desenvolvimento embrionário é acompanhado, observando a migração e proliferação das PGCs-GFP transplantadas.

\* Solução salina: deve ser previamente testada na espécie utilizada, a fim de obter melhores taxas de eclosão e normalidade em embriões e larvas.