



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

São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Transplante interespecífico de células germinativas-tronco em
Siluriformes Neotropicais

Lucia Suárez López
Bióloga

**Botucatu
2018**

TRANSPLANTE INTERESPECÍFICO DE CÉLULAS GERMINATIVAS-TRONCO EM SILURIFORMES NEOTROPICAIS

LUCIA SUÁREZ LÓPEZ

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Senhorini

Coorientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Unesp – *Campus* de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Botucatu–SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Suarez López, Lucia.

Transplante interespecífico de células
germinativas-tronco em Siluriformes Neotropicais / Lucia
Suárez López. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: José Augusto Senhorini

Coorientador: George Shigueki Yasui

Capes: 33004064

1. Células-tronco. 2. Células germinativas. 3.
Criopreservação. 4. Transplante de Células-Tronco.

Palavras-chave: Célula germinativas-tronco;
criopreservação; transplante celular.

Aprender a dudar es aprender a pensar.

(Octavio Paz).

Dedico

A mis padres por haberme legado la mayor herencia de todas, mi educación, y enseñarme todo lo necesario para poder enfrentar los retos de la vida, este logro es una muestra más de su esfuerzo y trabajo.

Agradecimentos

Agradezco a toda mi familia, en especial mis padres José del Carmen Suárez Rivera e Josefa López Vidal, a mis hermanas Ana Cristel y Patricia Suárez López porque desde el inicio de mi vida me han apoyado en todos mis sueños.

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu pela oportunidade de ingresso no mestrado. Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, sua coordenação e funcionários pelo apoio, instruções e paciência.

AES Tietê pelo o apoio financeiro para execução deste projeto e a bolsa concedida.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental pela utilização da sua estrutura, desde o alojamento em que me permitiram morar durante todo o tempo de mestrado, pelos materiais e licença para as coletas. Ainda agradeço a os pesquisadores e funcionários pelo apoio e amizade, muito obrigada.

Ao meu orientador, Dr. José Augusto Senhorini, por sua contribuição técnica neste trabalho, além de ser um grande pesquisador e professor. Tenho uma profunda admiração por sua leveza e serenidade como líder e pessoa.

Ao meu coorientador, Dr. George Shigueki Yasui, pelos ensinamentos, auxílio nos experimentos e importantes contribuições ao longo desta pesquisa. Além disso, agradeço pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

Ao Dr. Paulo Sérgio Monzani por sua imensa contribuição intelectual e técnica neste trabalho, além de sua amizade e confiança, não tenho palavras para agradecer.

Ao Dr. Diógenes H. de Siqueira Silva, por sua grande disponibilidade para tirar dúvidas e possibilitar o melhor andamento deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA, Nivaldo Ferreira do Nascimento, Mariana Machado Evangelista, Rafaela Manchin Bertolini, Bruna dos Santos Machado, Dilberto Ribeiro Arashiro, Nycolas Pereira, Matheus Pereira dos Santos, Leonardo Calado, Geovanna Coelho, Hatus Siqueira, Gustavo Shiguemoto, Natália R. de Alcântara Rocha, Talita Lázaro, Lauriene L. de Souza Munhoz, Leonardo Cuel Bortoletto, Natália G. Matheus e Daniela José de Oliveira, por sua amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório.

A família Bertolini, por me fazer sentir parte integrante da família todo este tempo, pela amizade, não tenho palavras para agradecer.

SUMARIO	RESUMO	1
ABSTRACT		2
1.INTRODUÇÃO GERAL.....		3
1.1 Transplante de células germinativas		4
1.2 Criopreservação de células germinativas		5
1.3 Espécies modelos		6
2.OBJETIVOS.....		8
2.1. Geral:		8
2.2. Específicos		8
3.Capítulo I: Isolamento e transplante de células germinativas-tronco de		
<i>Pseudopimelodus mangurus</i> em <i>Pimelodus maculatus</i> triploide.....		9
3.1 Materiais e métodos		9
3.1.1. Coleta dos animais		9
3.1.2. Produção de peixes triploides.....		9
3.1.3. Confirmação da ploidia.....		10
3.1.4. Dissociação enzimática das gônadas.....		11
3.1.5. Separação e purificação das células germinativas		12
3.1.6. Avaliação da viabilidade celular.....		12
3.1.7. Marcação das células germinativas dos doadores.....		13
3.1.8. Transplante de células germinativas		13
3.1.9. Avaliação de quimerismo por técnicas histológicas.....		14
3.1. 10. Avaliação de quimerismo por técnicas moleculares.....		14

3.1.11. Análise de reprodução dos receptores triploides transplantados.	16
3.1.12. Estatística.....	17
3.2 Resultados	18
3.2.1. Dissociação enzimática das gônadas e purificação das células germinativas	18
3.2.2. Transplante de células germinativas-tronco e análises de quimerismo	20
3.2.3. Análise de reprodução dos receptores triploides transplantados ...	23
4. Capítulo II: Isolamento e criopreservação de oogônias-tronco de <i>Pseudopimelodus mangurus</i>	26
4.1 Material e métodos	26
4.1.1 Animais	26
4.1.2 Criopreservação e procedimento de descongelamento	27
4.1.3 Estatística	28
4.2 Resultados	29
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	36
7. REFERENCIAS	38

Lista de Figuras

- Figura 1.** Procedimento de coleta e fertilização *Pseudopimelodus mangurus*. A) Obtenção de oócitos de *P. mangurus*. B) Separação dos oócitos em três alíquotas e fertilização com sêmen de *P. mangurus*, *Pimelodus maculatus* e *P. mangurus* triploides 17
- Figura 2.** Separação celular por gradiente de percoll. Banda 1: Debris celulares; Banda 2: Células germinativas-tronco; Banda 3: Células germinativas-tronco, espermátócitos e espermatozoides; Pellet: Espermatozoides e células sanguíneas. 19
- Figura 3.** Análise microscópica dos constituintes das bandas celulares vindas do gradiente de percoll: a) banda 1; b) banda 2, células germinativas (setas); c) banda 3; d) Pellet. Escalas =20µm..... 20
- Figura 4.** Marcação das células germinativas-tronco com PKH26 e transplante em mandis triploides: a) espermatogônias marcadas com PKH26; b) Mandi triploide recebendo transplante de células. Escala = 50µm..... 21
- Figura 5.** Gônadas dos receptores coletadas aos 30 e 120 dias pós-transplante: **a, b)** as células marcadas com PKH26 são observadas 30 dias pós-transplante na gônada receptora (setas); **c, d)** gônada 120 dias pós-transplante, com presença de oogônias; e com ausência de fluorescência. Escalas = 50µm..... 22
- Figura 6.** PCR usando gradiente de temperatura, para o gene hercc2. O produto de amplificação para *P. mangurus* foi visualizado acima 1Kpb (seta branca) e para *P. maculatus* de 900pb (seta vermelha), sendo a melhor temperatura de anelamento de 58 °C..... 22

Figura 7. Análise dos produtos de amplificação do gene *herc2* do doador, receptor e gônada do receptor. (1) Receptor (*P. maculatus*), (2) doador (*P. mangurus*) e (3) Gônada receptora 23

Lista de Tabela

Tabela 1. Estágios de desenvolvimento embrionário de *Pseudopimelodus mangurus* e dos híbridos de fêmeas de *P. mangurus* e machos de *Pimelodus maculatus*. Os dados foram obtidos de seis repetições e estão expressos como média $\pm$ erro padrão 25

Tabela 2. - Porcentagem de viabilidade de oogônias-tronco pós-descongelamento de *Pseudopimelodus mangurus*. Os dados foram obtidos de três repetições e estão expressos como média $\pm$ erro padrão 30

RESUMO

No Brasil os siluriformes neotropicais são o segundo grupo mais ameaçado de extinção com 91 espécies. Neste trabalho, foi empregada a técnica de quimerismo usando duas espécies de siluriformes neotropicais o mandi (*Pimelodus maculatus*) e o bagre sapo (*Pseudopimelodus mangurus*), visando a reconstituição da segunda espécie. Para tal foi estabelecido um protocolo de isolamento, separação, transplante e criopreservação de células germinativas tronco. As gônadas de *P. mangurus* foram digeridas enzimaticamente e as células germinativas tronco foram separadas por gradiente descontinuo de densidade, marcadas com PKH26 e transplantadas via papila urogenital em 32 receptores triploides de *P. maculatus*. Oito gônadas de *P. maculatus* que receberam transplantes foram analisadas por cortes histológicos e microscopia de epifluorescência para identificação das células germinativo tronco transplantadas, sendo encontradas células do doador em duas gônadas receptoras. Parte das gônadas, bem como do tecido muscular de *P. maculatus* e de *P. mangurus* foram utilizados para a extração do DNA genômico e serão utilizados para análise molecular, por a construção de primers, para confirmação do quimerismo. O protocolo estabelecido de criopreservação de células germinativas-tronco de *P. mangurus* permitirá transplante via intraperitoneal em larvas triploides, durante o período reprodutivo. Este trabalho é pioneiro no transplante de células germinativas-tronco em espécies de siluriformes neotropicais, usando receptores adultos triploides. Os resultados obtidos neste estudo poderá ser futuramente empregado em outras espécies nativas que están em perigo de extinção ou de importância na

aquicultura. **Palavras chave:** Célula germinativas-tronco, transplante celular, criopreservação.

ABSTRACT

In Brazil, Neotropical siluriformes are the second more endangered group with 91 species. In this work, the technique of chimerism was used with two species of Neotropical siluriformes, mandiá (*Pimelodus maculatus*) and bagre sapo (*Pseudopimelodus mangurus*), aiming the reconstitution of the second species. Therefore, was established a protocol for isolation; separation and transplantation of stem germ-cells. The gonads of *P. mangurus* were enzymatic digested and the stem germ-cells separated using a discontinuous density gradient, labeled with PKH26 and transplanted through the urogenital papillae in 32 triploids recipients of *P. maculatus*. The gonads of eight fish that have received the stem germ-cells were analyzed by histology and fluorescent microscopy for identification of the germ-cell transplanted, and cells from the donor fish were identified in the recipient gonads. For confirmation of chimerism, part of the gonads, as well the muscle tissue of *P. maculatus* and *P. mangurus* was used for extraction of genomic DNA, for primers construction and confirmation of the chimerism. The developed protocol for cryopreservation of stem germ-cells of *P. mangurus* will allow the transplant via urogenital papilla in triploid larvae during the spawning season. This work is pioneer in the transplant of stem germ-cells in Neotropical siluriformes using adult triploids as recipients. The results of this study may be applied in future endangered native species or with importance to aquaculture.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Na região neotropical foram identificadas 4.475 espécies de peixes em águas continentais (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003), sendo que cerca de 77% das espécies foram classificadas na classe Ostariophysi, a qual inclui as ordens Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes (ALBERT; PETRY e REIS, 2011). O Brasil, o qual está localizado na região neotropical, foram identificadas 2.587 espécies de peixes de águas doces, totalizando cerca 10% das espécies de peixes identificados no mundo (BUCKUP; MENEZES e GHAZZI, 2007). A ordem Siluriforme é a mais abundante com 1.915 espécies conhecidas, compreendidas em 15 famílias (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003; REIS et al., 2016).

Os impactos causados nas bacias hidrográficas, como a pesca predatória, introdução de espécies exóticas, contaminação aquática, destruição das matas ciliares e a construção de barragens para produção de energia pelas usinas hidrelétricas, refletem na acentuada redução das populações da ictiofauna brasileira (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003; AGOSTINHO; THOMAZ e GOMES, 2005; BELLARD; CASSEY e BLACKBURN, 2016).

Estima-se que 312 espécies de peixes continentais se encontram em perigo de extinção, como pode ser verificado no Livro Vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção, onde os Siluriformes são o segundo grupo mais afetado com 91 espécies ameaçadas (ICMBIO, 2016).

Por tanto, em vista das problemáticas acima citadas, a aplicação de biotecnologias reprodutivas, tais como manipulação cromossômica, criopreservação de gametas em nitrogênio líquido, androgênese, ginogênese e quimerismo, podem ser usadas para auxiliar na conservação e reconstituição de espécies ameaçadas de extinção, bem como na produção de peixes de alto valor comercial na aquicultura (YAMAHA et al., 2007; LUJIC et al., 2015).

1.1 Transplante de células germinativas

As células germinativas primordiais (PGCs) são células precursoras das células germinativas-tronco (espermatogônias ou oogônias), e estas últimas têm a capacidade de se reproduzirem indefinidamente, possuem alta plasticidade sexual podendo diferenciar-se em gametas de ambos sexos (OKUTSU et al., 2006; CINALLI; RANGAN e LEHMANN, 2008; NÓBREGA et al., 2010). As células germinativas-tronco transmitem informação genética para a geração seguinte, tanto pela herança citoplasmática como pela nuclear, e são importantes para manter a variabilidade genética de uma população (YASUI; FUJIMOTO e ARAI, 2010; LEE et al., 2013). Portanto, as PGCs e as células germinativas-tronco são alvos atrativos para a aplicação de biotécnicas reprodutivas, como o quimerismo, bem como para formação de banco genético através da criopreservação a longo prazo em nitrogênio líquido.

O quimerismo consiste em remover as células germinativa (PGCs, espermatogônias ou oogônias) do doador para ser transplantadas em receptor estéril, onde as células proliferaram e se desenvolverem em gametas com características genéticas do doador (OKUTSU et al., 2007; NÓBREGA et al., 2010; YOSHIZAKI, GORO et al., 2010; YOSHIZAKI, G et al., 2010).

Diferentes metodologias foram desenvolvidas para a geração de quimera germinativa em peixes. As PGCs têm sido utilizadas no transplante para embriões receptores no estágio de blástula, sendo coletadas de embriões doadores e transplantada em embriões receptores mediante o uso de micromanipulação (CIRUNA et al., 2002; YOSHIZAKI et al., 2002; SAITO et al., 2008; LI et al., 2016). Além disso, as PGCs e as células germinativas-tronco também podem ser transplantadas na cavidade peritoneal, perto da crista genital, de larvas triploides recém eclodidas (OKUTSU et al., 2007; YOSHIKAWA et al., 2017).

O método mais utilizado em adultos é o transplante de células germinativas-tronco em peixes estéreis, via papila urogenital. Para isso, os receptores são previamente tratados com busulfan, que é um agente quimioterápico e atua na supressão endógena das células germinativas. No entanto, a esterilização por este método químico não é permanente, uma vez que após alguns meses as células endógenas do receptor começam a se proliferar novamente (LACERDA et al., 2008; NÓBREGA et al., 2010; MAJHI et al., 2014; DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015). Alternativamente, técnicas de manipulação cromossômica, como a triploidização, podem ser usadas para esterilização do receptor, já que organismos triploides são geralmente estéreis ou inférteis (TAKEUCHI et al., 2016), sendo considerados receptores ideais de células exógenas, visando a geração de quimeras germinativas.

1.2 Criopreservação de células germinativas

A criopreservação de gametas de peixes é considerada uma estratégia de geração de banco genético, para estocagem a longo prazo e posterior reprodução artificial (LABBÉ; ROBLES e HERRAEZ, 2013). A criopreservação

de sêmen é uma técnica que tem sido eficientemente aplicada, podendo estes gametas serem utilizados para a manutenção de variabilidade genética em reprodução artificial ou reconstituição de espécies por androgênese. No entanto, o sêmen não preserva o material genético materno, como o plasma germinativo e DNA mitocondrial (YASUI; FUJIMOTO e ARAI, 2010), que são importantes para manter a variabilidade genética de uma população, bem como a manutenção das características genéticas da espécie. A criopreservação de oócitos e embriões de peixes ainda não foi obtida devido as características fisiológicas, como grande tamanho e grande quantidade de vitelo que dificulta a ação das moléculas crioprotetoras (LABBÉ; ROBLES e HERRAEZ, 2013). Em vista das desvantagens da criopreservação de espermatozoides e as dificuldades mencionadas anteriormente para criopreservar oócitos e embriões, as PGCs e as células germinativas-tronco são uma alternativa para a criopreservação e sua estocagem a longo prazo, devido ao tamanho reduzido e ausência de vitelo (RIESCO et al., 2012).

1.3 Espécies modelos

O grande número de espécies ameaçadas de Siluriformes no Brasil e a escassez de trabalhos envolvendo a técnica de quimerismo visando a conservação das espécies desta ordem, foram aspectos motivadores para a realização do presente trabalho. Duas espécies de Siluriformes neotropicais foram usadas como modelo experimental, visando o emprego da técnica de quimerismo para geração de banco genético e conservação de espécies ameaçadas. A espécie doadora escolhida foi o *Pseudopimelodus mangurus*, conhecido comumente como bagre sapo, e que ocorre nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai; e que foi categorizada como espécie vulnerável

no Livro Vermelho de Fauna Ameaçada na bacia do rio Paraná, principalmente no Estado de São Paulo (ABILHOA; DUBOC e MIKICH, 2004; PAULO, 2014).

A espécie selecionada como receptora foi o *Pimelodus maculatus*, popularmente conhecido como mandi amarelo, a qual é encontrada na bacia dos rios Paraná, Prata, Uruguai e Iguaçu, e apresenta boa aceitação na pesca comercial (GODOY, 1987; LOLIS e ANDRIAN, 1996; ALBERT; PETRY e REIS, 2011). As principais características para a escolha do mandi como espécie receptora foram as facilidades de reprodução, manejo e cultivo em cativeiro. Características que permitem a aplicação de metodologias laboratoriais como a produção de peixes triploides estéreis, por meio de choque de temperatura, tornando esta espécie ideal para ser receptores de células germinativas e desenvolver unicamente gametas da espécie doadora.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

- Produzir quimeras germinativas para a propagação mediada de bagre sapo, utilizando o transplante de células germinativas-tronco de bagre sapo para mandis adultos triploides.

2.2. Específicos:

- Estabelecer um protocolo de isolamento de células germinativas-tronco da espécie *Pseudopimelodus mangurus*, utilizando a dissociação enzimática das gônadas associado ao fracionamento celular por gradiente de densidade.
- Realizar transplante das células germinativas-tronco de *Pseudopimelodus mangurus* para a espécie *Pimelodus maculatus* triploide.
- Avaliar a geração de quimera germinativa através de técnicas histológicas e moleculares.
- Estabelecer um protocolo de criopreservação de oogônias-tronco de *Pseudopimelodus mangurus*, avaliando diferentes crioprotetores em diferentes concentrações molares.

Capítulo I: Isolamento e transplante de células germinativas-tronco de *Pseudopimelodus mangurus* em *Pimelodus maculatus* triploide

Este capítulo descreve o protocolo de isolamento de células germinativas-tronco da espécie *P. mangurus* usando um gradiente de densidade de Percoll, e seu subsequente transplante, utilizando receptores triploides da espécie *P. maculatus*.

3.1 Materiais e métodos

3.1.1. Coleta dos animais

O experimento foi realizado no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio) em Pirassununga - SP, nas instalações do Laboratório de Biotecnologia de Peixes. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/CEPTA, #010/2015) e SISBIO número 55725-1. As espécies utilizadas durante o experimento *P. mangurus* e *P. maculatus*, foram coletados no Rio Mogi Guaçu, na cidade de Pirassununga-SP.

3.1.2. Produção de peixes triploides

Fêmeas e machos da espécie *P. maculatus* foram submetidos a indução hormonal com hipófise de carpa, aplicando duas doses: a primeira dosagem de 0,5 mg/kg e a segunda de 5 mg/kg aplicada seis horas depois. Nos machos foram aplicadas apenas uma dose de 5 mg/kg, juntamente com a segunda dose de indução das fêmeas. Seis horas depois da última dose, as fêmeas

foram anestesiadas com mentol na concentração de 100 mg. L⁻¹ (Êxodo Científica, Brasil) e extrusadas fazendo uma leve pressão na cavidade abdominal, sendo os oócitos coletados em bacias de vidro secas. Os machos foram eutanasiados e as gônadas coletadas foram maceradas em solução de MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma #:021M8316) para imobilização dos espermatozoides. Posteriormente, o sêmen diluído em solução de MEM foi adicionado aos oócitos e os espermatozóides ativados pela adição de água, realizando movimentos circulares.

Os mandis triploides utilizados como receptores de células germinativas-tronco foram aqueles oriundos do trabalho de Bertolini (2018). Brevemente, os ovos fecundados de mandi foram submetidos a ao choque térmico de temperatura a 38°C, dois minutos pós-fertilização, com duração de dois minutos e voltados para a água a 26°C. Posteriormente, os embriões foram incubados em incubadoras flutuantes, alocados em aquários de 40 L, com aeração constante, e mantidos nas mesmas condições até a eclosão.

3.1.3. Confirmação da ploidia

As larvas foram mantidas até a idade adulta e a ploidia foi verificada por análise de citometria de fluxo, baseado no protocolo desenvolvido por XAVIER et al. (2017). Para tal, amostras da nadadeira caudal foram coletadas e colocadas em 120 µL de solução de lise contendo 9,53 mM de MgSO⁻⁴, 47,67 mM de KCl, 74 mM de sacarose, 0,6% de Triton e 15 mM de Tris em pH 8,0, e incubadas por 10 minutos. Logo após, foi adicionado 800 µL de solução de 0,01% de DAPI (dicloridrato de 4,6-diamidino-2-fenilindole) em solução salina de tampão fosfato de Dulbecco. As amostras foram filtradas em membrana de nylon de 30 µm e analisadas por citometria de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer,

Partec, GmbH, Alemanha). Como controle de ploidia foi utilizado sêmen de mandi diploide.

3.1.4. Dissociação enzimática das gônadas

O protocolo desenvolvido por LACERDA et al. (2006), para a dissociação enzimática dos testículos em peixes adultos, foi modificado e padronizado de acordo com nossos objetivos para o *P. mangurus*.

Quatro exemplares (dois machos e duas fêmeas) foram eutanasiados em solução anestésica de mentol na concentração de 100 mg. L⁻¹ (Êxodo Científica, Brasil). As gônadas foram coletadas em cabine de fluxo laminar (FUH12, VECO) e lavadas por 3 vezes em solução salina de Hanks balanceada (Sigma-Aldrich) contendo antibiótico gentamicina (1 µl por mL) (Sigma-Aldrich), a qual foi denominada solução de manutenção. Posteriormente, as gônadas foram trituradas com auxílio de lâmina de bisturi, lavadas repetidas vezes para retirar o excesso de sangue e então acondicionadas em tubo de centrifuga de 15 mL. As gônadas trituradas foram divididas aproximadamente em 1 g /10 mL uma solução de manutenção suplementada com 0,2 mg/mL de collagenase tipo I (*Celostidium histolyticum* Sigma- Aldrich) e submetidas a digestão enzimática.

Os tubos contendo os fragmentos das gônadas e collagenase foram agitadas em homogeneizador (Agitador PHOENIX) para aumentar o contato da enzima com os tecidos e ter uma melhor digestão. Após uma hora de digestão era adicionado 20 µg/mL de DNase I (Sigma-Aldrich) para degradação do DNA das células mortas, seguindo a digestão por mais duas horas. Os pequenos fragmentos restantes foram dissociados mecanicamente com auxílio de pipeta com 1 mL. Após, a dissociação celular, o material obtido foi duplamente filtrado

digestidos. Após a filtragem, o material foi centrifugado a 350 x g, durante 10 minutos (HERMLE Labnet, Z326K). O sobrenadante foi extraído e o pellet celular foi suspenso em solução de manutenção.

3.1.5. Separação e purificação das células germinativas

As células obtidas da dissociação e digestão enzimática das gônadas foram fracionadas, através de gradiente descontínuo de densidade utilizando-se Percoll (Sigma-Aldrich). O gradiente foi constituído de quatro concentrações diferentes, sendo de 10%, 20%, 30% e 40%. Colocando-se sequencialmente (de 40% para 10%) em um tubo de centrífuga de 15 mL. A suspensão de células foi depositada no topo da coluna contendo Percoll a 10%, e centrifugada a 800 x g durante 30 minutos (HERMLE Labnet, Z326K). Devido à diferença de densidade, as células concentram-se nas diferentes interfaces das soluções de Percoll, formando bandas visíveis, que foram coletadas para avaliação da viabilidade e do tipo celular presente em cada uma delas. As bandas que apresentaram maior concentração de células germinativas-tronco foram utilizadas para as etapas seguintes.

3.1.6. Avaliação da viabilidade celular

As células foram avaliadas quanto a viabilidade utilizando o corante Azul de Trypan (Sigma-Aldrich), o qual penetra em células inviáveis, cujas membranas foram danificadas durante o processo de dissociação enzimática, marcando-as em azul. Para isto, 10 µL de solução celular de cada banda do gradiente de Percoll foi misturada a este corante em uma câmara hematómica de Neubauer e a verificação foi realizada através de microscópio (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão).

3.1.7. Marcação das células germinativas dos doadores

O corante fluorescente PKH26 (*Red Fluorescent Cell Linker* - Sigma) foi utilizado para marcar a membrana citoplasmática, sendo que a fluorescência pode ser detectada por cerca de 120 dias. Desta forma, a padronização da marcação de células germinativas de *P. mangurus* com o PKH26 foi efetuada a partir de uma suspensão na concentração de 2×10^7 células/mL, sendo usado 8 μ L de PKH26 em 1 mL de solução de manutenção e 1 mL de suspensão de células (1:1) por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 2 mL de soro fetal bovino (FBS) por 1 minuto. Finalmente, o volume foi aumentado até 10 mL com solução de manutenção das células e centrifugado a $350 \times g$ durante 10 minutos (HERMLE Labnet, Z326K), sendo este procedimento repetido três vezes.

3.1.8. Transplante de células germinativas

Trinta e dois mandis triploides, com idade aproximada de um ano e cinco meses, foram usados como receptores de células germinativas da espécie doadora. Depois de avaliar e marcar as bandas celulares selecionadas, os peixes receptores foram anestesiados em solução anestésica de mentol na concentração de 100 mg. L^{-1} (Êxodo Científica, Brasil), para assegurar o bem-estar dos animais durante os procedimentos experimentais. O transplante foi realizado através da papila urogenital, com uma ponteira de 200 μ L, acoplada a uma seringa de 3 mL. Cada receptor recebeu em média 1 mL da solução celular, contendo cerca de 9.5×10^5 células germinais, via papila urogenital.

3.1.9. Avaliação de quimerismo por técnicas histológicas

As gônadas de 8 mandis receptores foram coletadas aos 30 dias (n=5) e 120 dias (n=3) pós-transplante. A análise foi realizada por microscopia de fluorescência das lâminas de gônadas de mandis transplantados com células germinativas de bagre sapo, marcadas com PKH26. Os exemplares transplantados tiveram suas gônadas removidas e fixadas, por cerca de 24 horas, em PBS contendo 10% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich). As amostras foram desidratadas em solução com concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), embebidos em paraplast (Sigma-Aldrich), e cortados em micrótomo equipado com lâmina aço (LEICA RM 2145), na espessura de 7 µm. Todo o material foi examinado por microscopia de fluorescência (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) e fotografado (NikonDSRi2, Nikon, Tóquio, Japão). Após a análise de fluorescência, as lâminas eram coradas com hematoxilina-eosina para verificar a posição das células transplantadas na gônada receptora.

3.1. 10. Avaliação de quimerismo por técnicas moleculares

As análises moleculares das gônadas das quimeras são realizadas utilizando genes específicos das espécies ou com tamanhos diferentes de amplicons usando os mesmos primers, ou ainda por análises de regiões de microssatélites. No caso de *P. mangurus*, ainda não existe nenhuma sequência gênica depositada nos bancos de dados que possam guiar as análises moleculares. Em relação ao *P. maculatus*, foi reportado na literatura primers de regiões de microssatélite para a avaliação de estudos populacionais. Várias estratégias foram utilizadas para realizar a análise molecular das gônadas dos animais transplantados. Inicialmente foram utilizados os primers de

microsatélites de *P. maculatus* desenhados por PAIVA e KALAPOTHAKIS (2008). Além disso, foi iniciada no Laboratório de Biotecnologia de Peixes (ICMBio-CEPTA) a construção e sequenciamento de biblioteca de microsatélite de *P. mangurus*, utilizando-se a metodologia de BILLOTTE et al. (1999), na busca de microsatélites específicos desta espécie para estudos de quimerismo e populacionais. A terceira estratégia consistiu na amplificação do gene *nanos1* de *P. mangurus* utilizando primers desenhados a partir de regiões conservadas, obtidas do alinhamento de sequências deste gene de peixes depositadas nos bancos de dados. Para tal, o DNA genômico de *P. mangurus* foi purificado com o uso do kit comercial E.Z.N.A. Tissue DNA (OMEGA) e utilizado para uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Além disso, o RNA total de oócitos de *P. mangurus* foi purificado com o uso de Trizol (Invitrogen), transformado em cDNA com o kit Superscript^R III First Strand (Invitrogen) usado para a amplificação via PCR. O produto de amplificação foi recuperado em gel de agarose a 1% com o uso do kit E.Z.N.A^R Gel Extraction (OMEGA), clonado no vetor pGEM-T easy e enviado para o sequenciamento. Na tentativa de amplificação do gene *nanos1* de *P. mangurus*, foram amplificados outros genes, cujas sequências foram utilizadas na tentativa de encontrar genes específicos de *P. mangurus* para a análise de quimerismo. Dentre eles, os primers desenhados para o gene *Herc²* foram os mais promissores, mostrando um padrão de amplificação diferencial para o *P. mangurus* e *P. maculatus*. Os primers desenhados para o gene *Herc²* foram 5'-CTCTAATATCAAGAGTCATCGAACA-3' e 5'-CGGGATTGGACTGCACATT-3'. A PCR foi realizada nas seguintes condições de ciclagem: inicialmente a reação foi incubada por 5 minutos a 94°C e seguida de 35 ciclos de

amplificação (94°C durante 45 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos). A otimização dos primers para o gene Herc² foram realizadas utilizando PCR com gradiente de temperatura. A padronização da reação foi realizada utilizando-se os DNA genômicos do doador (*P. mangurus*), do receptor (*P. maculatus*) e da gônada do receptor (30 dias pós-transplante). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com SYBER Safe, visualizadas em transluminador de ultravioleta e fotografados (ENDUROTM GDS, Labnet International, Inc).

3.1.11. Análise de reprodução dos receptores triploides transplantados

Seis fêmeas e dois machos de *P. mangurus* foram submetidos a indução hormonal com hipófise de carpa, aplicando duas doses: a primeira dosagem de 0,6 mg/kg e a segunda de 6 mg/kg, aplicada seis horas depois para as fêmeas de *P. mangurus*. Nos machos, foi aplicada uma dose de 6 mg/kg, juntamente com a segunda indução das fêmeas. Posteriormente, dois machos de *P. maculatus* e quatro possíveis quimeras de *P. maculatus* triploides que receberam células germinativas-tronco de bagre sapo, também foram submetidos a indução hormonal aplicando uma dose única de 10 mg/kg. Os machos de *P. maculatus* e *P. mangurus* normais e transplantados foram eutanasiados em solução anestésica de mentol na concentração de 100 mg. L⁻¹ (Êxodo Científica, Brasil), as gônadas coletadas foram maceradas em solução de MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma #:021M8316) para imobilização dos espermatozoides. Posteriormente, as fêmeas de *P. mangurus*, cinco horas e meia depois da última dose, foram sometidas a uma solução

anestésica de mentol na concentração de 100 mg. L⁻¹ (Êxodo Científica, Brasil), e extrusadas. Os oócitos coletados foram divididos em três alíquotas, transferidos a placas petri e fertilizados usando o sêmen diluído em solução de MEM (bagre sapo, mandi e possíveis quimeras) adicionando-se aos oócitos de bagre sapo e os gametas ativados pela adição de água (Figura 1).

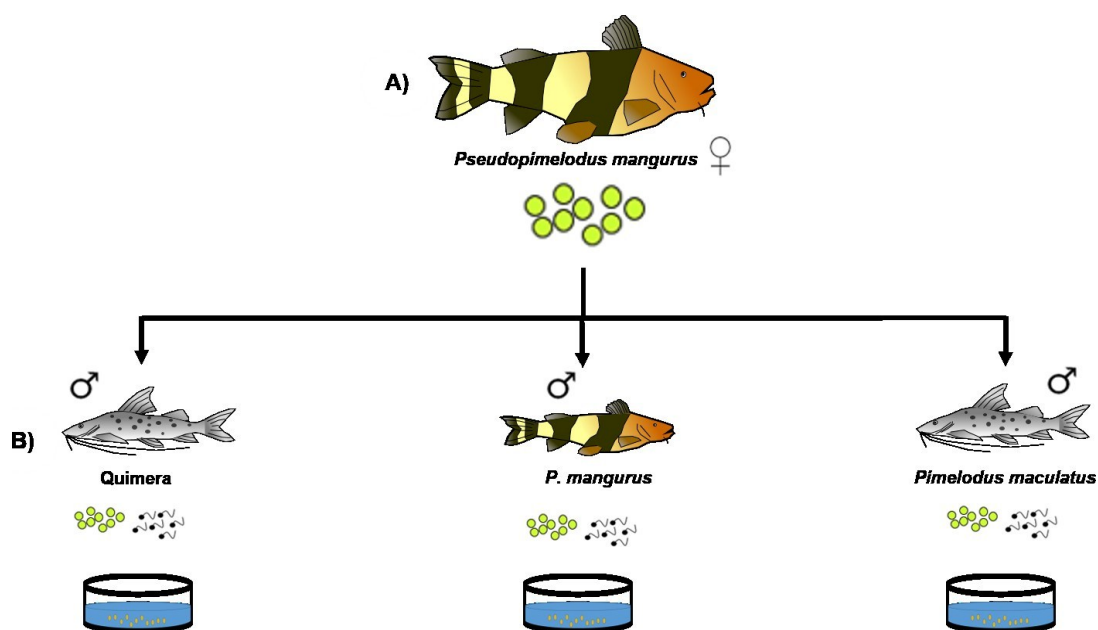


Figura 1. Procedimento de coleta e fertilização *Pseudopimelodus mangurus*. **A)** Obtenção de oócitos de *P. mangurus*. **B)** Separação dos oócitos em três alíquotas e fertilização com sêmen de *P. mangurus*, *Pimelodus maculatus* e *P. maculatus triploides*

3.1.12. Estatística

Os dados foram obtidos de seis repetições e apresentados como a média $\pm$ EP. As porcentagens de viabilidade foram, transformadas em arco seno, submetidas a ANOVA e, em seguida, as medias foram comparadas utilizando o teste de múltiplo alcance de Tukey. Em todas as análises, foi utilizado o software STATISTICA (R, V 3.0.3, EUA) utilizando $\alpha = 5\%$.

3.2 Resultados

3.2.1. *Dissociação enzimática das gônadas e purificação das células germinativas*

O protocolo aplicado para a dissociação enzimática das gônadas da espécie *P. mangurus* foi considerado eficiente, quando foi utilizado animais adultos fora da estação reprodutiva. No gradiente de percoll foi verificado três bandas nas concentrações de 10%, 20% , 30% um pellet visível na fundo do tubo, tanto para oogônias como espermatogônias (Figura 2). Para as espermatogônias, a primeira banda continha unicamente debris celulares, a segunda banda (20%) se concentrou o maior número de espermatogônias-tronco, com viabilidade média de 85%. A terceira banda continha espermátócitos, espermatozoides e algumas espermatogônias-tronco, no pellet foi observado unicamente espermatozoides. Para as oogônias, a primeira banda (10%) continha debris celulares, na segunda banda (20%) foi observada a maior concentração de oogônias com viabilidade média de 87%. Na terceira banda (30%) foi observada grande concentração de oócitos, células somáticas e pouca quantidade de oogônias. O pellet era constituído apenas por células sanguíneas (Figura 3).

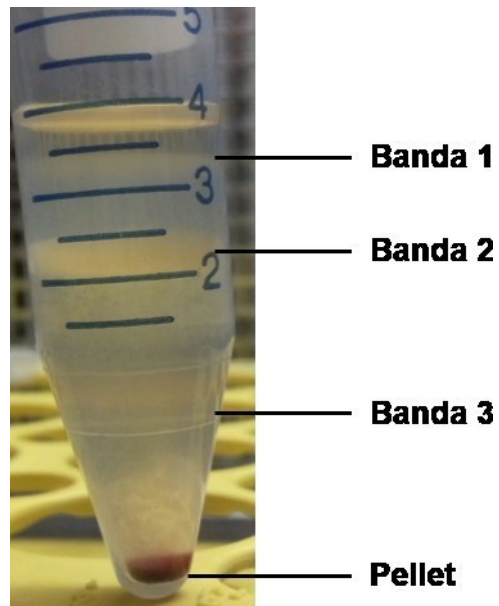


Figura 2. Separação celular por gradiente de percoll. Banda 1: Debris celulares; Banda 2: Células germinativas-tronco; Banda 3: Células germinativas-tronco, espermatócitos e espermatozoides; Pellet: Espermatozoides e células sanguíneas.

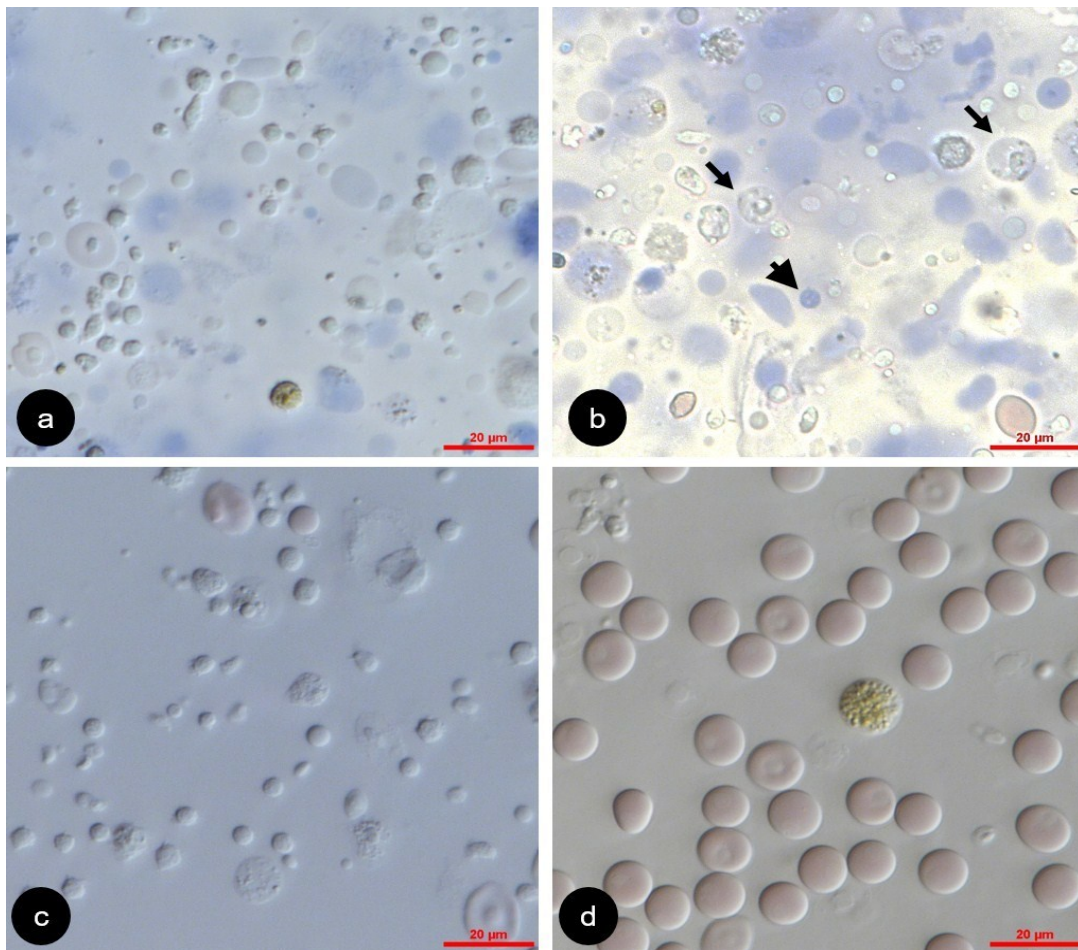


Figura 3. Análise microscópica dos constituintes das bandas celulares vindas do gradiente de percoll: a) banda 1; b) banda 2, células germinativas (setas); c) banda 3; d) Pellet. Escalas =20µm.

3.2.2. Transplante de células germinativas-tronco e análises de quimerismo

As células obtidas na banda 2 do gradiente com 20% de percoll eram na grande maioria as células germinativas-tronco. Estas células foram marcadas usando PKH26 e transplantadas via papila urogenital nas gônadas dos receptores triploides de *P. maculatus* (Figura 4). Dois gônadas receptoras das cinco que foram sometidas análises histológicas 30 dias pós-transplante (um macho e uma fêmea) foram evidenciadas a presença de células marcadas com PKH26 da espécie doadora, estando localizadas no epitélio da gônada (Figura 5). Aos 120 dias pós-transplante não foram observadas células marcadas nas gônadas dos receptores, portanto não foi possível avaliar se as células transplantadas estavam proliferando nas gônadas dos receptores (Figura 5). Estas análises podem não ter sido satisfatória uma vez que elas foram realizadas no limite máximo de tempo da duração da fluorescência.

As gônadas dos receptores sometidas a PCR, tiveram o mesmo padrão de amplificação que o *P. maculatus*, por tanto não foi possível detectar na gônada receptora o gene *HERC^2* de *P. mangurus*. Estou podo haber acontecido talvez porque parte da gônada usada para análise de PCR tinha pouca quantidade de células de *P. mangurus* em relação com do *P. maculatus*. Já que as gônadas sometidas a PCR tinham 30 dias de haber recebido o

transplante de células, sendo pouco tempo para poder multiplicar-se. Além de isso, os primers precisam ser melhorados, para ser mais específicos, por loque os produtos de PCR tanto de *P. maculatus* e *P. mangurus* serão sequenciados novamente para refazer primers mais específicos.

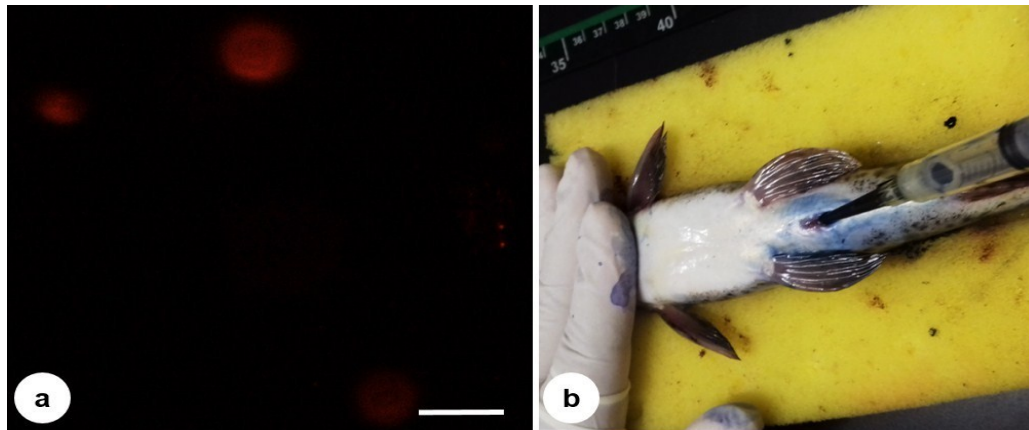


Figura 4. Marcação das células germinativas-tronco com PKH26 e transplante em mandis triploides: **a)** espermatogônias marcadas com PKH26. Escala = 50µm. **b)** Mandi triploide recebendo transplante de células.

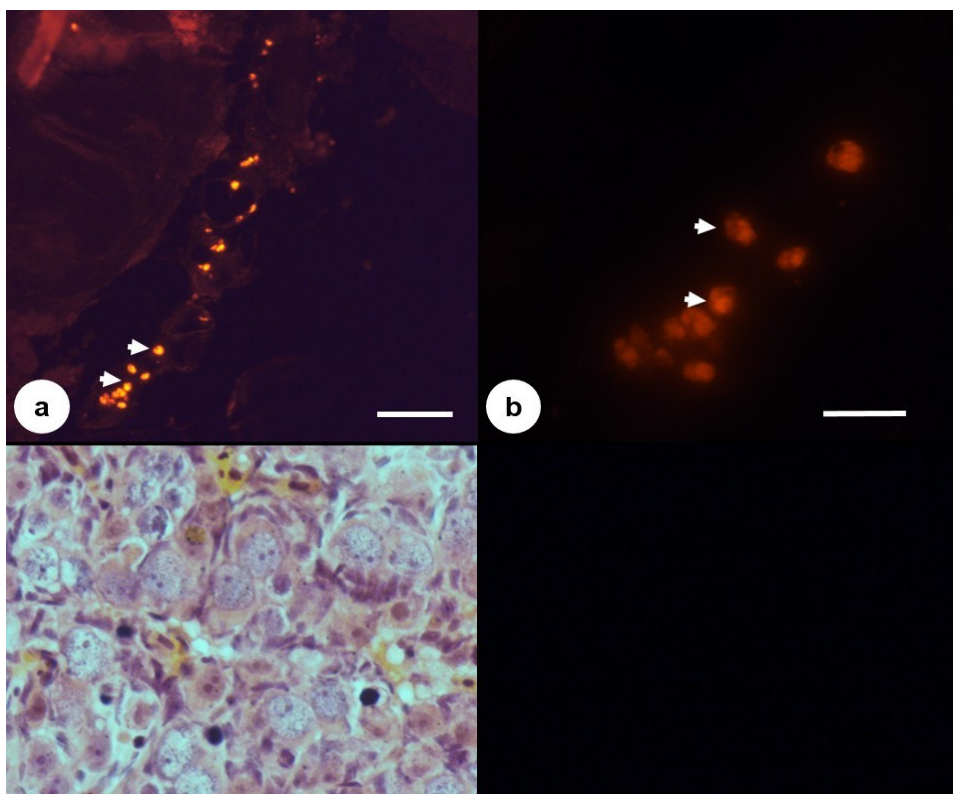


Figura 5. Gônadas dos receptores coletadas aos 30 e 120 dias pós-transplante: **a, b)** as células marcadas com PKH26 são observadas 30 dias pós-transplante na gônada receptora (setas); **c,** **d)** gônada 120 dias pós-transplante, com presença de oogônias; e com ausência de fluorescência. Escalas = 50µm.

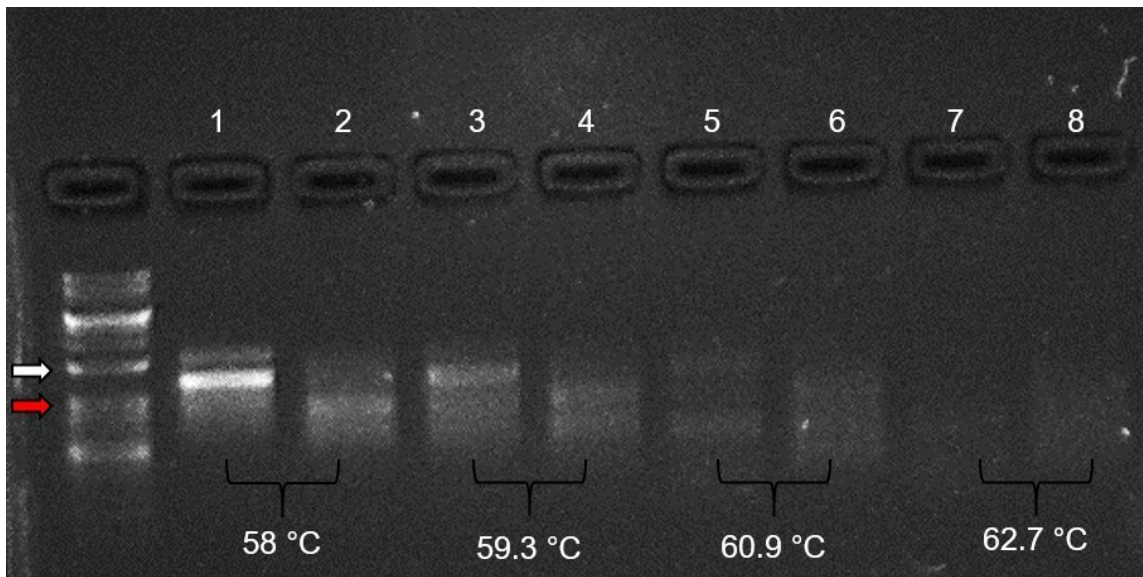


Figura 6. PCR usando gradiente de temperatura, para o gene hercc2. O produto de amplificação para *P. mangurus* foi visualizado acima 1Kpb (seta branca) e para *P. maculatus* de 900pb (seta vermelha), sendo a melhor temperatura de anelamento de 58 °C.

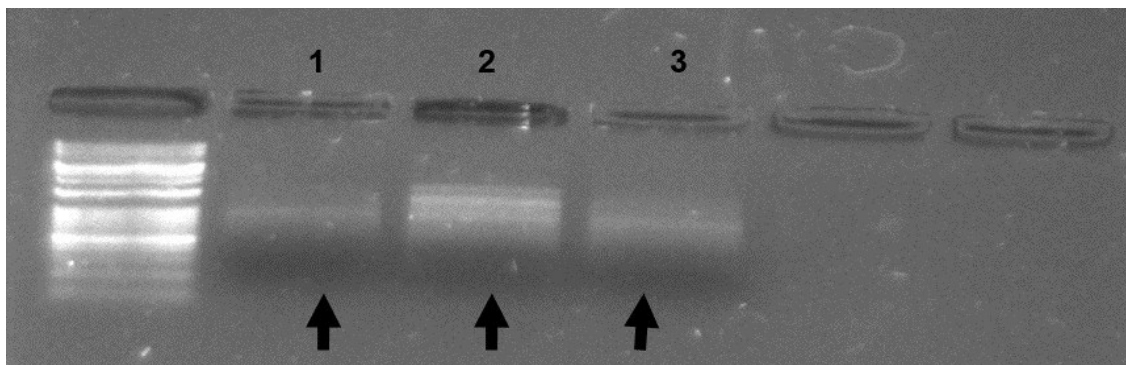


Figura 7. Análise dos produtos de amplificação do gene *herc2* do doador, receptor e gônada do receptor. (1) Receptor (*P. maculatus*), (2) doador (*P. mangurus*) e (3) Gônada receptora.

3.2.3. Análise de reprodução dos receptores triploides transplantados

Para a avaliação da geração de quimeras germinativas funcionais foram utilizados macerado de gônadas provenientes de quatro mandis triploides, transplantados com células germinativas-tronco de *P. mangurus*, visando a fertilização dos ovos da espécie mencionada anteriormente. Nos resultados indicaram que não houve a fertilização dos ovos das fêmeas de *P. mangurus*. No entanto, as gônadas aparentemente ainda não estavam desenvolvidas e pouco espermatozoides podiam ser visualizados nos macerados das gônadas. Como controle, também foram utilizados macerados de gônadas de machos de *P. mangurus* e de *P. maculatus* em ambos casos a fertilização dos ovos foram bem-sucedidas, inclusive com os híbridos sendo viáveis. O desenvolvimento dos grupos controles foram acompanhados até a fase de eclosão e os não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos controles de *P. mangurus*

e dos híbridos. Os resultados para cada fase embrionária se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Estágios de desenvolvimento embrionário de *Pseudopimelodus mangurus* e dos híbridos de fêmeas de *P. mangurus* e machos de *Pimelodus maculatus*. Os dados foram obtidos de seis repetições e estão expressos como média $\pm$ erro padrão.

Espécie doadora de sêmen	Estádios de desenvolvimento embrionário (%)							
	Não fertilizados	Clivagem	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Larvas normais	Larvas anormal
<i>P. mangurus</i>	3,88 $\pm$ 2,14	95,35 $\pm$ 2,32	86,26 $\pm$ 5,62	79,41 $\pm$ 7,33	58,61 $\pm$ 8,11	16,60 $\pm$ 10,76	11,73 $\pm$ 8,13	4,95 $\pm$ 2,64
<i>P. maculatus</i>	3,74 $\pm$ 2,16	96,77 $\pm$ 1,75	92,71 $\pm$ 2,05	83,21 $\pm$ 1,16	57,13 $\pm$ 8,25	23,06 $\pm$ 11,20	17,95 $\pm$ 9,77	5,11 $\pm$ 1,68
<i>P-value</i>	0,968	0,768	0,432	0,777	0,877	0,717	0,726	0,866

3. Capítulo II: Isolamento e criopreservação de oogônias-tronco de *Pseudopimelodus mangurus*

O seguinte capítulo descreve o protocolo de criopreservação de oogônias-tronco da espécie *P. mangurus*, avaliando cinco crioprotetores em três concentrações diferentes. Esta etapa visou a estocagem a longo prazo, avaliação de viabilidade e posterior constituição de bancos genéticos.

4.1 Material e métodos

4.1.1 Animais

O experimento foi realizado no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA/ICMBio) em Pirassununga, São Paulo, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/Cepta, #010/2015) e SISBIO 55725-1; as instalações do Laboratório de Biotecnologia de Peixes.

Durante o experimento três fêmeas de *P. mangurus*, com média de peso de 1,7 kg, e os procedimentos de isolamento foram realizados como previamente descritos no capítulo 1. As suspensões celulares de oogônias-tronco obtidas foram quantificadas usando câmera de Neubauer e a viabilidade mensurada através do corante Azul de Trypan (Sigma-Aldrich). Para isto, 10 µL de solução celular foi misturada a este corante em uma câmera hematimétrica de Neubauer e a verificação foi realizada através de microscópio Olympus CX41.

4.1.2 Criopreservação e procedimento de descongelamento

As oogônias-tronco (OG) das três fêmeas foram processadas individualmente. Antes do congelamento a suspensão celular foi diluída 1:1 na solução crioprotectora (50 µl OG+ 50 µl solução crioprotectora). As soluções crioprotetoras foram preparadas por solução de Hanks modificada (Sigma-Aldrich) suplementadas com 100 mM de glicose, 1% de soro albumina bovina e os crioprotetores individuais (etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) e propaneidol) em concentrações de 2 M, 3 M e 4 M. Após a associação da suspensão celular e solução crioprotectora, as concentrações finais dos constituintes das soluções caíram para a metade do indicado. Alíquotas contendo 70 µl solução crioprotectora e celular foram colocadas em paletas transparentes de criopreservação de sêmen (IMV Technologies). As avaliações para cada solução crioprotectora e para cada amostra gônadal foram realizados em triplicata. Em seguida as paletas foram acondicionadas dentro de Criotubos (Corning Incorporated), colocadas dentro de um CoolCell (Biocision) e transferidos para um freezer -80°C por duas horas, posteriormente foram imersos em nitrogênio líquido (-196°C), onde permaneceram estocados.

O descongelamento foi realizado a 30°C em um banho-maria durante 1 minuto, em seguida as mostras foram colocadas dentro de tubos Eppendorf de 1,5 mL e centrifugadas a 350 x g durante 5 minutos (HERMLE Labnet, Z326K). O sobrenadante foi extraído e o pellet celular resuspendido em 30 µL de solução Hanks modificada (Sigma-Aldrich), contendo o antibiótico gentamicina uma concentração de 1 µg / mL (Sigma-Aldrich) e 5 µL de azul Tripan para marcação das células inviáveis. A contagem foi realizada por triplicata de cada

crioprotector e concentração molar, usando uma câmara de Neubauer e microscópio Olympus CX41.

4.1.3 Estatística

Os dados foram obtidos em triplicata para cada crioprotector e concentração molar, apresentados como a média $\pm$ EP. As porcentagens de viabilidade foram, transformadas em arco seno, submetidas a ANOVA e, em seguida, as medias foram comparadas utilizando o teste de múltiplo alcance de Tukey. Em todas as análises, foi utilizado o software STATISTICA (R, V 3.0.3, EUA) utilizando $\alpha = 5\%$.

4.2 Resultados

4.2.1. Viabilidade das oogônias-tronco antes e depois da criopreservação com o efeito dos crioprotetores.

A eficácia dos cinco crioprotetores e um controle foi avaliada através da porcentagem das células viáveis antes do congelamento e depois do congelamento. A viabilidade celular das três fêmeas antes do congelamento foi de $93\% \pm 1,30\%$. De acordo com as análises estatísticas, não teve diferença significativa entre os cinco crioprotetores analisados e as diferentes concentrações molares (Tabela 2). No controle sem crioprotector não foi encontrado células viáveis. Utilizando a média para escolha do melhor crioprotector, o propaneidol a 1,5 M foi aquele que apresentou os melhores resultados com $80,00\% \pm 9,5\%$ de viabilidade pós-descongelamento, seguido do glicerol a 2 M, com $73,00\% \pm 2,75\%$. De forma geral, foi observado um aumento na viabilidade quando as concentrações dos crioprotetores foram aumentadas de 1 M para 1,5 M, seguido da diminuição da viabilidade quando a concentração molar do crioprotector foi aumentada de 1,5 M para 2 M, com exceção de etilenoglicol que diminuiu sua viabilidade de 1 M para 1,5 M e glicerol que aumentou a viabilidade de 1,5 M para 2 M.

Tabela 2. - Porcentagem de viabilidade de oogônias-tronco pós-descongelamento de *Pseudopimelodus mangurus*. Os dados foram obtidos de três repetições e estão expressos como média $\pm$ erro padrão.

Crioprotector	Concentração Molar			<i>P-value</i>
	1 M	1.5 M	2 M	
Controle	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	-
DMA	58,00 $\pm$ 3,30	71,00 $\pm$ 11,6	56,00 $\pm$ 0,26	0,618
Propaneidol	58,00 $\pm$ 8,10	80,00 $\pm$ 9,5	63,00 $\pm$ 1,91	0,173
Glycerol	63,00 $\pm$ 10,40	67,00 $\pm$ 15,7	73,00 $\pm$ 2,75	0,851
DMSO	60,00 $\pm$ 4,26	66,00 $\pm$ 3,80	66,00 $\pm$ 6,48	0,676
Etilenoglicol	56,00 $\pm$ 10,53	53,00 $\pm$ 5,30	49,00 $\pm$ 5,18	0,798
Média	59,00 $\pm$ 1,18	67,40 $\pm$ 4,37	61,40 $\pm$ 4,13	0,556
<i>P-value</i>	0,971	0,479	0,303	

4. DISCUSSÃO

Os protocolos estabelecidos neste trabalho, incluindo o de isolamento de células-tronco, usando a dissociação enzimática e, gradiente de densidade, bem como o transplante interespecífico de células germinativas, via papila urogenital, usando peixes triploides estéreis, e a criopreservação de oogônias-tronco foram realizados pela primeira vez nestas espécies de peixes de Siluriforme Neotropicais. Na avaliação de quimerismo nas gônadas dos receptores por histologia, foram observadas células germinativas marcadas dos doadores, quando avaliadas aos 30 dias pós-transplante, em dois receptores de um total de cinco animais que foram avaliados. Aos 120 dias pós-transplante, não foram observadas células germinativas marcadas com PKH26 na gônada dos três receptores analisados, por tanto não foi possível a avaliação de quimerismo neste grupo.

Na análise molecular de apenas uma gônada do receptor de grupo avaliado 30 dias do transplante, não foi possível detectar a presença do gene *herc2* de *P. mangurus* (doador), na gônada de *P. maculatus* (receptor). Apesar de ter sido detectado células marcadas nesta gônada por análise histológica, sua quantidade pode ter sido pequena em relação com as células germinativas do receptor ou não estarem totalmente distribuídas pela gônada. A fração da gônada avaliada por PCR poderia conter quantidades muito baixas de células germinativas do doador, ou talvez estas células poderiam estar inviáveis, uma vez que após 30 dias do transplante, as células foram encontradas nos dutos das gônadas e não em seu interior. Estes aspectos podem ter contribuído para a não amplificação da banda de *P. mangurus* na gônada do receptor. Além disso, os primers para o gene *herc2* de *P. mangurus* devem ser redesenhados

para melhorar a especificidade da amplificação. Para isto, as principais bandas amplificadas de *P. mangurus* e *P. maculatus* serão enviadas para sequenciamento. Vale lembrar que os primers foram feitos a partir de sequência de cDNA e os primers foram utilizados para amplificar o DNA genômico, sendo os fragmentos amplificados maiores que daquele desenhado vindo do cDNA. Isto pode ser devido a presença de introns.

O transplante de células germinativas para animais adultos também foi realizado em espécies neotropicais como *Brycon orbignyanus* e *Rhamdia quelen* que foram usados como doadores de células germinativas. Nestes trabalhos que utilizaram tratamento com busulfan como agente esterilizador de adultos diploides, foram acompanhados os desenvolvimentos da espermatogênese nas gônadas dos receptores até 120 dias pós-transplante, sendo identificado em cortes histológicos espermatozóides marcados com PKH26 e espermatozoides do receptor, porém sem avaliação da funcionalidade destes espermatozoides (LACERDA et al., 2008; DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015).

Resultados similares utilizando busulfan foram publicados com o peixe *Odontesthes hatcheri* como receptores. Neste estudo, os autores identificaram a produção de gametas funcionais da espécie doadora *Odontesthes bonariensis* na espécie receptora. Os machos da quimera germinativa foram utilizados para fecundar fêmeas de *O. bonariensis* sendo cerca de 12,6 a 39,7% de proles pura. Enquanto que o cruzamento entre fêmeas quimeras e machos de *Odontesthes hatcheri* produziram cerca de 52% de prole pura (MAJHI et al., 2014). Todos os receptores mencionados anteriormente foram tratados com o agente químico busulfan para a supressão das células

endógenas, a qual não é permanente. Neste método ocorre a competição pela ocupação de nichos livres entre as células do doador e as células do receptor. A eliminação de células endógenas das gônadas dos receptores causada pela ação do busulfan é um fator importante, para que as células do doador possam se proliferar e colonizar eficientemente a gônada receptora (DOBRINSKI, 2006).

A produção de peixes triploides estéreis como receptores de células germinativas-tronco é uma opção alternativa ao método químico de esterilização. Esta estratégia de geração de quimeras germinativas foi eficientemente empregada em salmonídeos (OKUTSU et al., 2007), *Nibea mitsukurii* (HIGUCHI et al., 2011; YOSHIKAWA et al., 2017), *Scomber japonicus* (YAZAWA et al., 2010) e *Seriola quinqueradiata* (MORITA et al., 2012; MORITA et al., 2015). Nestes estudos, as PGCs ou células germinativas-tronco foram transplantadas via intraperitoneal, no estágio larval de receptores triploides e na fase adulto estas quimeras produziram gametas apenas da espécie doadora. A grande vantagem do uso de animais triploides estéreis sobre a esterilização química por busulfan é que apenas os gametas da espécie doadora são produzidos ou viáveis. Alguns transplantes via intraperitoneal de espermatogônias-tronco de *P. mangurus*, marcadas com PKH26, para *P. maculatus* ou *Astyanax altiparanae* triploides foram realizados em nosso laboratório, e ainda serão analisados por técnicas histológicas e moleculares.

O transplante via intraperitoneal é realizado em um período específico da fase larval, a fim de evitar rejeição das células transplantadas. Portanto, esta metodologia deve ser aplicada somente no período reprodutivo, no qual o

isolamento de células germinativas-tronco é impossibilitado nas fêmeas devido ao estágio vitelínico dos oócitos. No macho ocorre a diferenciação celular das espermatogonias em espermatozoides, levando a baixa concentração das células germinativas-tronco. Desta forma, o isolamento das células germinativas-tronco durante a fase de multiplicação destas células é mais eficiente. O uso da criopreservação deste tipo celular é uma estratégia interessante para a formação de bancos genéticos, e seu posterior transplante em receptores estéreis, tanto adulto como em larvas (durante o período reprodutivo), principalmente se a espécie se torne ameaçada de extinção.

O isolamento de células germinativas-tronco das gônadas de peixes adulto é mais fácil que o isolamento de PGCs de embriões, podendo ser injetado um grande número de células germinativas-tronco dentro da cavidade peritoneal (SAITO et al., 2008; YOSHIZAKI et al., 2010). Pensando no uso desta metodologia durante o período reprodutivo, foi desenvolvido um protocolo de criopreservação de oogonias-tronco para o *P. mangurus*, com média de células viáveis em torno de 80% pós-descongelamento, para o melhor crioprotetor avaliado. O objetivo de estabelecer bancos genéticos *in vitro* é de se manter maior nível de diversidade genética (OKUTSU et al., 2006; YOSHIZAKI et al., 2011; LINHARTOVÁ et al., 2014). A criopreservação de células germinativas-tronco de *P. mangurus* permitirá o transplante via intraperitoneal em larvas triploides, durante o período reprodutivo, como foi reportado em truta arco íris (LEE et al., 2015; LEE; IWASAKI e YOSHIZAKI, 2016), *Brachymyxa lenok* (LEE e YOSHIZAKI, 2016).

Esta é a primeira vez que peixes triploides adultos de *P. maculatus* são utilizados como receptores de células germinativas-tronco. Antes de ser

realizado o transplante de células do doador, as gônadas dos receptores estava ocupada por células germinativas iniciais endógenas, e de acordo autores como (NÓBREGA et al. (2010); LACERDA et al. (2012)), as células germinativas do doador precisam de um nicho livre para poder colonizar e desenvolver-se na gônada receptora, afim de evitar a competição com as células germinativas do receptor. Por tanto, uma estratégia para melhorar a eficácia do transplante em peixes triploides adultos, seria a combinação de outros métodos como o uso de busulfan, o qual atuaria na supressão das células germinativas endógenas, abrindo lacunas nas gônadas do receptor, para que as células germinativas do doador possam se proliferar e colonizar.

Os resultados da não fertilização dos ovos de *P. mangurus* usando sêmen de quimeras de *P. maculatus*, pode haver acontecido porque as gônadas das quimeras utilizadas estavam fase de desenvolvimento contendo pouco espermatozoides como foi visualizado nos macerados das gônadas. De acordo com o trabalho de Bertolini (2018), os machos triploides de *P. maculatus* não produzem espermatozóides, desenvolvendo unicamente espermatócitos. Os híbridos obtidos da fertilização de ovos de *P. mangurus* e sêmen de *P. maculatus*, serão futuramente analisados e submetidos a técnicas como a triploidização para ser possíveis receptores de células germinativas-tronco, com o objetivo de minimizar a rejeição de células em o transplante de larvas e peixes adultos triploides.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O isolamento e transplante de células germinativas-tronco foi realizado pela primeira vez em duas espécies de siluriformes neotropicais, usando como receptores peixes adultos triploides. Os primers utilizados para avaliação de quimerismo precisam ser melhorados, por tanto os produtos de PCR de *P. maculatus* e *P. mangurus* serão sequenciados novamente para refazer primers mais específicos, e posteriormente serão avaliadas todas as gônadas usadas nos estudos histológicos e de fertilização. Além disso, serão feitas a construção e sequenciamento de biblioteca de microssatélite de *P. mangurus*, na busca de microssatélites específicos desta espécie para posteriores estudos de quimerismo e populacionais.

A criopreservação de oogônias-tronco de *P. mangurus* foi estabelecida com sucesso, sendo o propaneidol 1.5 M o melhor crioprotector para sua estocagem a longo prazo em nitrogênio líquido. Este foi um passo importante para a constituição de bancos genéticos de oogônias de *P. mangurus* visando o transplante via intraperitoneal em larvas triploides de *P. maculatus*. Esta estratégia é importante para a conservação e restauração de espécies ameaçadas de extinção ou de importância na aquicultura, utilizando receptores com reprodução mais rápidas e com sucessivos eventos reprodutivos.

A rejeição nos transplantes tem sido discutida por vários pesquisadores e, portanto, a produção de receptores que apresentem menor rejeição é fundamental para o sucesso da aplicação das técnicas de quimerismo germinativo. O uso de híbridos triploides de *P. mangurus* e *P. maculatus* pode ser uma estratégia que minimize a rejeição do transplante tanto em adultos com em larvas.

A proliferação de células germinativas-tronco em gônadas de receptores adultos depende da formação de nichos livres de células germinativas endógenas. Por tanto o uso de busulfan em triploides adultos receptores, anterior ao transplante, pode ser uma estratégia que aumente a eficácia desta técnica de quimerismo germinativo.

Pouco se sabe sobre a rejeição de células transplantadas em peixes, por tanto, o estudo da ação imunológica básica é fundamental, para a ação do uso de imunossupressores em o transplante de células germinativas em peixes. A avaliação do uso de imunossupressor anterior à transplante pode ser uma estratégia que pode melhorar a eficácia da técnica de quimerismo.

Com tudo, os resultados obtidos em esta pesquisa serviram como base para realizar outros estudos que permitam gerar com sucesso uma quimera germinativa.

6. REFERENCIAS

- ABILHOA, V.; DUBOC, L. e MIKICH, S. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. **Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná (IAP). 630p.[Links]**, 2004.
- AGOSTINHO, Â. A.; THOMAZ, S. M. e GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 70-78, 2005.
- ALBERT, J. S.; PETRY, P. e REIS, R. E. Major biogeographic and phylogenetic patterns. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, p. 21-57, 2011.
- BELLARD, C.; CASSEY, P. e BLACKBURN, T. M. Alien species as a driver of recent extinctions. **Biology Letters**, v. 12, n. 2, p. 20150623, 2016. ISSN 1744-9561.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.; RISTERUCCI, A.-M.; BAURENS, F.-C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, n. 4, p. 277-288, 1999. ISSN 0248-1294.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. e GHAZZI, M. S. A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional Rio de Janeiro, 2007.
- CINALLI, R. M.; RANGAN, P. e LEHMANN, R. Germ cells are forever. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 559-562, 2008. ISSN 0092-8674.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 14919-14924, 2002. ISSN 0027-8424.
- DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; DOS SANTOS SILVA, A. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033-1042, 2015. ISSN 0093-691X.
- DOBRINSKI, I. Transplantation of germ cells and testis tissue to study mammalian spermatogenesis. **Anim Reprod**, v. 3, n. 2, p. 135-145, 2006.
- HIGUCHI, K.; TAKEUCHI, Y.; MIWA, M.; YAMAMOTO, Y.; TSUNEMOTO, K.; YOSHIZAKI, G. Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. **Fisheries science**, v. 77, n. 1, p. 69-77, 2011. ISSN 0919-9268.
- GODOY, M. P. Peixes do Estado de Santa Catarina. **Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.**, v. 57, 1987.
- ICMBIO. ICMBio □ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2016. Sumário executivo do Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de

extinção. . **Sumário executivo do Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_da_fauna_brasileira_ameacada_de_extincao_2016.pdf 2016.

LABBÉ, C.; ROBLES, V. e HERRAEZ, M. **Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation:** Woodhead Publishing Ltd 2013.

LACERDA, S.; APONTE, P.; COSTA, G.; CAMPOS-JUNIOR, P.; SEGATELLI, T.; SILVA, M.; FRANÇA, L. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. **Anim Reprod**, v. 9, n. 4, p. 798-808, 2012.

LACERDA, S.; BATLOUNI, S.; SILVA, S.; HOMEM, C.; FRANÇA, L. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Anim Reprod**, v. 3, n. 2, p. 146-159, 2006.

LACERDA, S.; BATLOUNI, S. R.; ASSIS, L. H.; RESENDE, F. M.; CAMPOS-SILVA, S. M.; CAMPOS-SILVA, R.; SEGATELLI, T. M.; FRANCA, L. R. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Cybiurn**, v. 32, n. 2, p. 115-118, 2008.

LEE, S.; SEKI, S.; KATAYAMA, N.; YOSHIZAKI, G. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

LEE, S.; IWASAKI, Y.; SHIKINA, S.; YOSHIZAKI, G. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 5, p. 1640-1645, 2013. ISSN 0027-8424.

LEE, S.; IWASAKI, Y. e YOSHIZAKI, G. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. **Cryobiology**, v. 73, n. 2, p. 286-290, 2016. ISSN 0011-2240.

LEE, S. e YOSHIZAKI, G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 165-168, 2016. ISSN 0011-2240.

LINHARTOVÁ, Z.; RODINA, M.; GURALP, H.; GAZO, I.; SAITO, T.;
 □3□â□(□1□,□ý□.□\$□,□ □0□.□ □,□V□R□O□D□W□L□R□Q□ □D□Q□G□ □
 tench (*Tinca tinca*). **Czech J. Anim. Sci**, v. 59, p. 381-390, 2014.

LI, M.; HONG, N.; XU, H.; SONG, J.; HONG, Y. Germline replacement by blastula cell transplantation in the fish medaka. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

LOLIS, A. e ANDRIAN, I. D. F. Alimentação de *Pimelodus maculatus* Lacépède 1803 (Siluriformes, Pimelodidae), na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 1996.

LUJIC, J.; BERNATH, G.; MARINOVIC, Z.; LEFLER, K.; URBANYI, B.; HORVATH, A. Spermatogonial Transplantation As A Novel Technique In Aquaculture And Fish Conservation. 2015.

MAJHI, S. K.; HATTORI, R. S.; RAHMAN, S. M.; STRÜSSMANN, C. A. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95294, 2014. ISSN 1932-6203.

MORITA, T.; KUMAKURA, N.; MORISHIMA, K.; MITSUBOSHI, T.; ISHIDA, M.; HARA, T.; KUDO, S.; MIWA, M.; IHARA, S.; HIGUCHI, K. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Biology of reproduction**, v. 86, n. 6, p. 176-176, 2012. ISSN 0006-3363.

MORITA, T.; MORISHIMA, K.; MIWA, M.; KUMAKURA, N.; KUDO, S.; ICHIDA, K.; MITSUBOSHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Functional Sperm of the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were produced in the small-bodied surrogate, Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*). **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 644-654, 2015. ISSN 1436-2228.

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**, v. 5, n. 9, p. e12808, 2010. ISSN 1932-6203.

OKUTSU, T.; AYAKA, Y.; NAGASAWA, K.; SHIKINA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 6, p. 685-693, 2006. ISSN 0916-8818.

OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517-1517, 2007. ISSN 0036-8075.

OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2725-2729, 2006. ISSN 0027-8424.

PAIVA, A. L. B. e KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 5, p. 1078-1080, 2008. ISSN 1755-0998.

PAULO, S. **DECRETO Nº 60.133, DE 7 DE FEVEREIRO DE 2014**. 2014
REIS, R.; ALBERT, J.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M.; PETRY, P.; ROCHA, L. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016. ISSN 1095-8649.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. e FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003. ISBN 8574303615.

RIESCO, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; CHEREGUINI, O.; ROBLES, V. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 122-130. e2, 2012. ISSN 0093-691X.

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 1, p. 159-166, 2008. ISSN 0006-3363.

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**, 2016. ISSN 0044-8486.

XAVIER, P. L.; SENHORINI, J. A.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A.; DOS SANTOS, S. A.; YASUI, G. S. A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in genetics**, v. 8, p. 131, 2017. ISSN 1664-8021.

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**, v. 58, n. 1, p. 8-22, 2007. ISSN 1385-1101.

YASUI, G. S.; FUJIMOTO, T. e ARAI, K. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. **Aquaculture**, v. 308, p. S140-S144, 2010. ISSN 0044-8486.

YOSHIKAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; INO, Y.; WANG, J.; IWATA, G.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). **Aquaculture**, v. 478, p. 35-47, 2017. ISSN 0044-8486.

YOSHIZAKI, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. **Development**, v. 137, n. 8, p. 1227-1230, 2010. ISSN 0950-1991.

YOSHIZAKI, G.; OKUTSU, T.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; TAKEUCHI, Y. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. **Anim Reprod**, v. 7, n. 3, p. 187-96, 2010.

YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, Y.; KOBAYASHI, T.; IHARA, S.; TAKEUCHI, T. Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 3-12, 2002. ISSN 0920-1742.

germ cells in cytoablated adult fish. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95294, 2014. ISSN 1932-6203.

MORITA, T.; KUMAKURA, N.; MORISHIMA, K.; MITSUBOSHI, T.; ISHIDA, M.; HARA, T.; KUDO, S.; MIWA, M.; IHARA, S.; HIGUCHI, K. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Biology of reproduction**, v. 86, n. 6, p. 176-176, 2012. ISSN 0006-3363.

MORITA, T.; MORISHIMA, K.; MIWA, M.; KUMAKURA, N.; KUDO, S.; ICHIDA, K.; MITSUBOSHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Functional Sperm of the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were produced in the small-bodied surrogate, Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*). **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 644-654, 2015. ISSN 1436-2228.

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**, v. 5, n. 9, p. e12808, 2010. ISSN 1932-6203.

OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517-1517, 2007. ISSN 0036-8075.

OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2725-2729, 2006. ISSN 0027-8424.

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 1, p. 159-166, 2008. ISSN 0006-3363.

YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y.; HIGUCHI, K.; YATABE, T.; KABEYA, N.; YOSHIZAKI, G. Chub Mackerel Gonads Support Colonization, Survival, and Proliferation of Intraperitoneally Transplanted Xenogenic Germ Cells 1. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 5, p. 896-904, 2010. ISSN 0006-3363.

YOSHIKAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; INO, Y.; WANG, J.; IWATA, G.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). **Aquaculture**, v. 478, p. 35-47, 2017. ISSN 0044-8486.

YOSHIZAKI, G.; FUJINUMA, K.; IWASAKI, Y.; OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y. Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 55-61, 2011. ISSN 1744-117X.

YOSHIZAKI, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. **Development**, v. 137, n. 8, p. 1227-1230, 2010. ISSN 0950-1991.