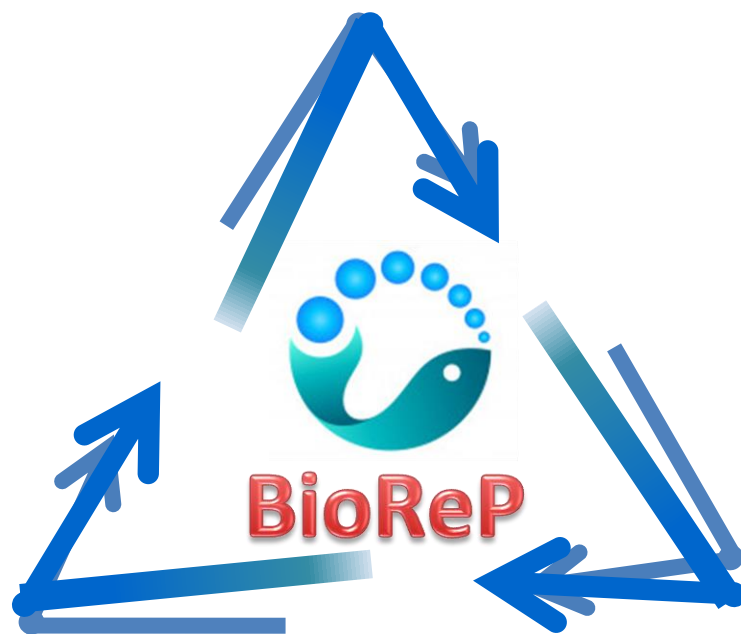




UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA ANIMAL



BIOREP: Biotecnologias reprodutivas em peixes e crustáceos

Coordenador Geral: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra

Coordenador Adjunto: Prof. Dr. Marcelo Augusto Bezerra

Professores colaboradores: Michelly Fernandes de Macedo

Carlos Eduardo Bezerra de Moura

Pós graduandos: Danilo Lourenço de Albuquerque

Colaboradores externos: Aline Gabrielle Gomes da Silva

Entidades Parceiras: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS

Ministério do Desenvolvimento Regional

Piscicultura Tanganyika

MOSSORÓ/RN

JULHO - 2020

O que é o BioReP?

É um **Programa de Biotecnologia para Reprodução de Peixes e Crustáceos** que apresenta grande potencial para ampliação do setor aquícola de corte e ornamental no Nordeste e para o país. A aquicultura biotecnológica vem para atender a uma demanda já evidenciada por anos nesse setor com maior crescimento na área da produção animal nos últimos anos (FAO, 2018).

Quais os Objetivos do BioReP?

Seu principal objetivo é desenvolver e aprimorar ferramentas reprodutivas para aumentar a produção de espécies aquáticas em ambientes continentais e marinhos, com o desenvolvimento de tecnologias de **Cultivo *In Vitro* e Transplantes de Células Reprodutivas**, promovendo assim o fornecimento de alevinos e consequente desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil.

Objetivos secundários podem ser resumidos em: aprimorar a técnica de “barriga substitutiva” para peixes e crustáceos de valor comercial; desenvolver protocolo para produção de peixes triplóides que sirvam como receptores para reprodução em cativeiro; isolar e cultivar células-tronco da linhagem germinativa (espermatozônias e oogônias) e produzir matrizes e reprodutores substitutivos de espécies com nenhuma ou difícil através do transplante de células-tronco da linhagem germinativa bem como gerar dados sobre a fisiologia e eventuais patologias nas espécies aqui estudadas

Como alcançar esses objetivos?

Para que nossos objetivos sejam alcançados vamos expandir nossos horizontes de pesquisas na área animal, ultrapassar novas barreiras para alcançar linhas de trabalho pautados no compromisso contínuo e aplicado, evoluindo da pesquisa básica. Vamos unir e aumentar o conjunto de dados e *expertises* em biologia e biotecnologias reprodutivas, fisiologia, patologia, bioquímica, histologia, hematologia e genética como suporte ao cultivo de organismos aquáticos, e com isso integrar o conteúdo dos profissionais na universidade.

A incorporação dos conhecimentos entre as áreas da Engenharia de Pesca e Medicina Veterinária a outras áreas de tecnologias propiciam um novo cenário e benefícios para o desenvolvimento da aquicultura do país, traz ganhos inestimáveis para o meio ambiente e para UFERSA, que será a primeira no nordeste a abordar essa linha de pesquisa.

O programa engloba vários projetos que irão proporcionar pesquisas para estudantes de graduação e pós-graduação das áreas de medicina veterinária, engenharia de pesca, biotecnologia, zootecnia e demais áreas afins sempre pautados em pesquisas tecnológicas, transferência de tecnologia e empreendedorismo.

Que Projetos Integram o Programa BioReP?

- I. Produção de triplóides de peixes para uso em biotécnicas reprodutivas
- II. Caracterização, isolamento e cultura de espermatogônias e oogônias de peixes e crustáceos;
- III. Criopreservação de gônadas e células germinativas (oogônias e espermatogônias) de peixes e crustáceos;
- IV. Transplantes de células germinativas em peixes

Como operacionalizar o Programa BioReP?

Alguns objetivos dos projetos que integram este programa serão realizados por alunos de graduação e pós-graduação. Para suprir a demanda por recursos financeiros, pretendemos realizar parcerias públicas com instituições governamentais nos âmbitos estadual e federal, participando de editais de fomento, além de parcerias público-privadas ligadas ao ramo da aquicultura comercial ornamental e de corte.

PROJETOS DO PROGRAMA

1. PRODUÇÃO DE TRIPLÓIDES DE PEIXES PARA USO EM BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS

1.1. Introdução

A aquicultura tem contribuído para o fornecimento de proteína animal para o consumo humano pela produção de peixes e crustáceos. O número de espécies de peixes comercializados para reprodução ou engorda é amplo, sendo algumas bastante apreciadas e de elevada importância econômica. Entretanto, como parte delas apresenta reprodução tardia, baixa fecundidade e/ou não conseguem se reproduzir naturalmente em cativeiro, a intervenção humana se faz necessária, gerando demandas tecnológicas importantes.

A reprodução de peixes enfrenta barreiras reprodutivas, que afetam a oferta de alevinos no mercado. Este cenário possibilitou o emprego de novas técnicas como, por exemplo, o transplante de células tronco germinativas, que vêm sendo utilizado nas duas últimas décadas em mamíferos e que, para peixes apresenta elevado impacto biotecnológico devido às suas características reprodutivas.

A utilização da técnica de triploidização já é empregada mundialmente com resultados bem significativos para aquicultura. Esta técnica serve para esterilizar peixes, o que favorece no crescimento e uniformização do lote com melhor aproveitamento de carcaça (NASCIMENTO et al., 2017), como já é usada para o salmão. Entretanto, ela também vem sendo usada para o fornecimento de exemplares estéreis, resultado da falta de desenvolvimento gonadal provocado pela incompatibilidade dos conjuntos cromossômicos (CHOURROUT et al., 1986). Outra importante aplicação é no desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas de transplantes de células tronco germinativas, popularmente conhecida no Brasil como “barriga de aluguel” com vista à preservação de espécies (AMBIENTAL BRASI, 2015).

Trabalhos recentes foram publicados em função de demandas relacionadas à produção de receptores triplóides ($3n$) (LACERDA et al., 2010; 2013; YOSHIZAKI; LEE, 2018). No Brasil vários trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos na última década sobre o tema, como os realizados para as espécies jundiá *Rhamdia quelen* (SILVA et al., 2007; WEISS; ZANIBONI-FILHO, 2009; 2010; com a tilápia e seus híbridos (BRAMICK et al., 1995; AVILA, 2004; HASSAN et al., 2018); com lambari *Astyanax altiparanae* (FONSECA et al., 2011; MARTINS, 2019); tambaqui e seus híbridos (SATO, 2015); mandi *Pimelodus maculatus* (BERTOLINI, 2018), dentre outras espécies.

A poliploidização é uma técnica de manipulação cromossômica em que os indivíduos possuem quatro conjuntos de cromossomos homólogos (WEBER et al., 2015). Triplóides podem ser encontrados em populações selvagens de peixes (CENTOFANTE et al., 2001; SILVA et al., 2011; SATO, 2015) ou através da indução com uso de métodos físicos e químicos (TIWARY et al., 2004; HUERGO; ZANIBONI-FILHO, 2008). Quando induzida, a reprodução com hormônios é realizada seguida da união dos gametas para fertilização. Minutos depois de fertilizados os ovos são submetidos a processos que favorecem a retenção do segundo corpúsculo polar por um determinado tempo e condições específicas para cada espécie.

Os processos para indução da triploidia podem ser por choques de temperatura, pressão hidrostática, produtos químicos como a colchicina e a citocalasina (PIFERRER et al., 2009; SATO, 2015) e choques elétricos (HASSAN et al., 2018). A eficácia dos tratamentos para indução da triploidização está relacionada ao tempo de iniciação do choque, à intensidade e à duração

(DUNHAM, 2004). Após o tratamento, os peixes são submetidos à engorda e em determinado momento são testados para confirmação da triploidia.

A confirmação da produção de exemplares $3n$ pode ser feita por alguns processos já estabelecidos na literatura. Estas verificações acontecem mais comumente pelas contagens de cromossomos (HASSUN et al., 2018; OKOMODA et al., 2018a; LIU et al., 2001) e pela caracterização eritrocitária (NORMALA et al., 2016; OKOMODA et al., 2018b). Para preparação cromossômica em peixes são utilizados os métodos *in vivo* (BERTOLLO et al., 1978) e o método *in vitro* (FORESTI et al., 1993), através da análise de vários tecidos dos peixes, principalmente de rim, brânquia ou baço. Essas avaliações pressupõem que o peixe deva ter um tamanho mínimo adequado.

A análise eritrocitária demonstra que, em peixes triplóides, os eritrócitos são maiores em comparação com os diplóides (KARAMI et al., 2010; NORMALA et al., 2016). Para realizar a análise dos eritrócitos é necessária a retirada do sangue (1 gota para o esfregaço) de peixes que receberam o tratamento, para avaliar o tamanho e formato dos eritrócitos ($3n$) e comparar com exemplares não submetidos aos tratamentos (HASSUN et al., 2018). Este tipo de avaliação vem sendo aprimorada nos últimos anos e demonstra confiabilidade nos resultados, além de ser mais simples e rápida. Contudo pode não servir todas as espécies, necessitando do desenvolvimento de protocolos específicos e individuais, justificando esse estudo.

Devido à crescente demanda por peixes triplóides e à característica da esterilidade importante para a produção de receptores de transplantes, este trabalho visa contribuir com a produção de protocolos para aumentar a disponibilidade de espécies de peixes triplóides para serem usados na aquicultura e em biotécnicas reprodutivas neste grupo de animais.

1.2. Objetivos

Geral

Produzir peixes triplóides ($3n$) estéreis para serem utilizados em biotécnicas reprodutivas como receptores de células germinativas de espécies ameaçadas de extinção e/ou com potencial para aquicultura de corte e ornamental.

Específicos

- Montar protocolo de produção de peixes receptores estéreis ($3n$) em larga escala através das técnicas de triploidização;
- Avaliar e desenvolver métodos menos invasivos de verificação de $3n$ nos indivíduos submetidos aos tratamentos;
- Avaliar a possível esterilidade dos $3n$ resultantes;
- Avaliar a sobrevivência e possíveis deformidades ocasionadas pela indução;

- Verificar o desempenho zootécnico dos 3n na aquicultura;

1.3. Justificativa

Conforme já foi salientado, a necessidade de peixes 3n vem crescendo bastante nos últimos anos, tanto para serem usados diretamente no cultivo, como para seu emprego em técnicas biotecnológicas da reprodução. A abordagem de produção de exemplares 3n já é bastante difundida e largamente utilizada mundialmente, com a finalidade de produção de exemplares poliplóides, que demonstram características peculiares para o setor aquícola mundial.

Ademais, poucas são as espécies com alto potencial para a aquicultura que têm protocolos desenvolvidos para produção de peixes 3n. Assim, o presente trabalho vem reafirmar sua contribuição no desenvolvimento de tecnologias para a produção aquícola

1.4. Material e Métodos

1.4.1. Espécies utilizadas

As espécies a serem utilizadas para os experimentos foram escolhidas estrategicamente com base na proximidade filogenética a muitas espécies dentro de sua ordem ou família, que demonstram grande importância ambiental (espécies com risco de extinção) e uso na aquicultura de corte e/ou ornamental. O uso de 3n na produção está vinculado ao domínio da reprodução artificial de algumas espécies fora do ambiente natural e que após a triploidização demonstram desenvolvimento e crescimento rápidos, o que é bom para seu emprego em técnicas biotecnológicas. Essas espécies de peixes, listadas abaixo, já são comercializadas comumente por pisciculturas no país e no mundo e apresentam proximidade filogenética com outras de grande importância para atividade aquícola e que não conseguem se reproduzir em cativeiro mesmo com indução.

- *Astyanax bimaculatus*;
- *Colossoma macropomum*;
- *Leporinus friderici*;
- *Leporinus obtusidens*;
- *Oreochromis niloticus*;
- *Pangasius hypophthalmus*
- *Piaractus brachipomus*;

- *Piaractus mesopotamicus*;
- *Pimelodus maculatus*;

Todos os exemplares serão adquiridos junto a empresas parceiras dos laboratórios SerTãoMar (UFERSA) cujos manuseios das espécies já são devidamente autorizadas pelos órgãos ambientais competentes.

Para a produção dos ovos, os reprodutores de cada espécie serão distribuídos em tanques apropriados de 15 mil litros com aeração contínua. Cada tanque conterá machos e fêmeas que permanecerão juntos por serem peixes reofílicos e não apresentarem comportamento agressivo. Por outro lado, as tilápias serão separadas por sexo para evitar a reprodução. Todos os exemplares serão marcados eletronicamente com chips para melhor identificação do sexo e controle, serão alimentados com ração para reprodutores em quantidade e granulometria compatível com seu tamanho e peso.

1.4.2. Identificação dos exemplares

De forma a identificar os exemplares, os mesmos serão marcados individualmente com um microchip de 8 a 12 mm a depender do tamanho de cada animal. Os microchips *encapsulados* em vidro biocompatível, possuem números únicos de até 39 dígitos e atendem a ISO 11784/85 FDX-B. Eles serão aplicados subcutaneamente próximos à nadadeira dorsal dos animais com uso de aplicador individual esterilizado e descartável.

Para que o procedimento seja executado, os animais serão anestesiados com substâncias amplamente utilizadas e seguras para peixes (SIMÕES et al., 2012). Tanto a benzocaína quanto o óleo de cravo serão diluídos em solução mãe será preparada na proporção de 100 gramas ou 100 ml, respectivamente em 1 litro de álcool (70%) e armazenados em frascos de vidro âmbar com tampa rosqueada. As concentrações das soluções-mãe serão então diluídas conforme as necessidades das espécies apresentados na tabela abaixo. Após constatada a inteira sedação de cada animal, ele será retirado da água com toalha úmida e terá o local da aplicação desinfetado com solução de povidine degermante e posteriormente será lavado com extrato de alho.

Quadro 1: Espécies, anestésico e doses a serem utilizados para chipagem dos peixes

Espécie	Nome comum	Anestésico	Dose	Referência
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Benzocaína	100 mg L	(GIMBO et al., 2008)
<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Óleo de cravo	50mg L	(SAKABE et al., 2010)
<i>Leporinus friderici</i>	Piau três pintas	Óleo de cravo	25 mg L	(HAHN et al., 2007)
<i>Leporinus obtusidens</i>	Piau verdadeiro	Óleo de cravo	50 mg L	(MOTA, 2013)

<i>Oreochromis spp.</i>	Tilápias	Óleo de cravo	75 mg L	(VIDAL et al., 2008)
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Panga - tubarão de água doce	Óleo de cravo	20 mg L	(HOSEINI et al., 2013)
<i>Piaractus brachipomus</i>	Pirapitinga	Óleo de cravo	50 mg L	(MARTINS et al., 2014)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pacu	Benzocaína e óleo de cravo	150 mg L e 100 mg L respectivamente	(RODRIGUES et al., 2015; OLIVEIRA, 2009)
<i>Pimelodus maculatus</i>	Mandi	Metanol Óleo de cravo	100 mg L e 100 mg L	(BERTOLONI, 2018 ; LUCENA et al., 2013)

Em seguida à marcação, o peixe irá para a caixa de recuperação com água corrente limpa e com oxigenação constante, posteriormente à sua recuperação será transferido para seu tanque.

1.4.3. Obtenção dos ovos para triploidização

Os ovos serão obtidos pela indução de machos e fêmeas da mesma espécie e de espécies diferentes (quando for o caso dos peixes redondos para produção de híbridos). Após a indução, os ovos serão extrusados para obtenção a seco e, ainda a seco, homogeneizados com os espermatozoides, posteriormente será adicionada água para que ocorra a fertilização.

Para indução da maturação final e desova dos peixes, será utilizado hormônio gonadotrófico comumente realizado nas pisciculturas de todo mundo. Para as fêmeas serão aplicadas duas doses (WOYNAROVICH E HORVÁTH, 1983) e nos machos apenas dose única, no momento em que as fêmeas recebem a segunda aplicação. O procedimento mais usual para indução é a hipófises de carpa desidratadas análogo de GnRH (HARVEY; CAROLSFELD, 1993). Todas as doses utilizadas para estas espécies seguirão trabalhos já publicados e as praticadas comumente nas pisciculturas, sempre com base no peso dos animais (Quadro 2).

Quadro 2: Hormônio para indução e dose a serem utilizadas nas espécies para produção de triplóides

Espécie	Hormônio	Dose	Referência
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC)	5 mg/kg (fêmeas 20% e 80%, 14 horas depois da primeira) e 3mg/ kg (machos dose única) no momento da segunda dose das fêmeas	(ORBOLATO et al., 2006; MARCON et al., 2019).
<i>Colossoma macropomum</i>	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC)	5,5 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 12 horas da primeira) e 2,5 mg/kg (machos dose única) no momento da segunda dose	(STREIT JÚNIOR et al., 2012).

		das fêmeas.	
<i>Leporinus friderici</i>	EBHC	1,5 mg/kg (fêmeas 33,% e 67%, após 6 horas da primeira) e 1 mg/kg (machos dose única) no momento da segunda dose das fêmeas.	(SAMPAIO; SATO, 2009; SOUZA, 2015).
<i>Leporinus obtusidens</i>	EBHC	5 mg/kg (fêmeas 10% e 90%, 12 horas depois da primeira) e 3mg/ kg (machos dose única) no momento da segunda dose das fêmeas	(QUEROL et al., 2013).
<i>Oreochromis spp.</i>	Gonadotrofina coriônica humana (hCG)	5000 UI/kg (fêmeas 10,% e 90%, após 18 horas da primeira)	(HASSUN et al., 2018).
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Ovaprim (20 µm de GnRHa e 10 mg de domperidona)	0,3 e 0,6 ml/ kg nas fêmeas e 0,4 ml/kg machos .	(LEGENDRE et al., 2000).
<i>Piaractus brachypomus</i>	EBHC	5,5 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 12 horas da primeira) e 2 mg/kg (machos dose única 0,5 ml/kg) no momento da segunda dose das fêmeas.	(LIMA, 2014).
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	EBHC	6 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 10 horas da primeira) e 3 mg/kg (machos dose única 0,5 ml/kg) no momento da segunda dose das fêmeas.	(GUERREIRO et al., 2011).
<i>Pimelodus maculatus</i>	EBHC	5,5 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 6 horas da primeira) e 5 mg/kg (machos dose única 0,5 ml/kg) no momento da segunda dose das fêmeas.	(BERTOLINI, 2018).

1.4.4. Produção de triploides

Para cada espécie estudada, um total de 21 mil ovos serão utilizados em função de combinações entre métodos de triploidização, triplicatas e tratamentos. Os testes para produção de triploides serão realizados por três metodologias diferentes a saber: a) por choques elétricos, b) temperatura e c) pressão, seguindo as metodologias já descritas na literatura para este fim.

a) Indução à triploidia por choques elétricos

Após a fertilização, os ovos obtidos das espécies serão equitativamente divididos e submetidos a choques por 2, 3, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos de exposição, adaptando a metodologia já usada para tilápias vermelhas (HASSAN et al., 2018). As correntes contínuas da bateria serão ajustadas para produzirem um campo elétrico com 6, 12 e 24V. As extremidades positiva e negativa são as sondas elétricas e serão colocadas nas bordas dos aquários de 40 litros para cada tratamento (tempo e voltagem) e o controle sem choque. Todos terão uma tampa com 21 furos circulares para colocar as peneiras com os respectivos ovos pós-fertilização (Figura 1).

Em cada peneira será colocada a mesma quantidade de ovos, que serão alinhadas em triplicatas em cada tempo pré-determinado de exposição aos choques elétricos e elétricos e posteriormente colocados em estruturas para devida incubação. Todos os testes serão realizados com temperatura ambiente da água.

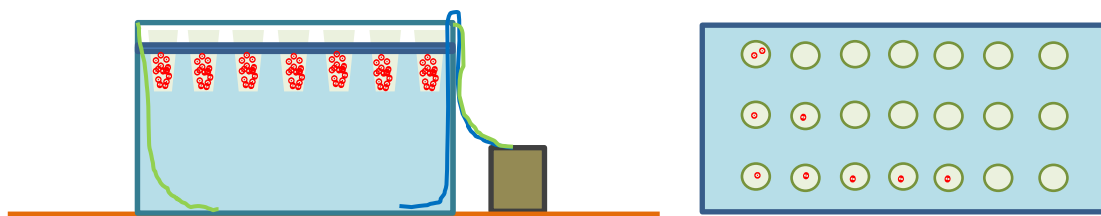


Figura1: A) Esquema da vista lateral do aquário, B) Esquema da vista superior do aquário para produção de triplóides por choque elétrico.

Para que seja gerado um melhor campo elétrico, os ovos serão incubados em salinidade entre 5 PSU, o que favorece o conforto osmótico até a eclosão dos ovos (HASSUN et al., 2018). Os tempos e choques serão monitorados por cronômetro digital e a voltagem por um voltímetro digital.

Durante a incubação parâmetros de qualidade de água serão monitorados, como: salinidade, temperatura, pH, OD, amônia e sólidos, até a eclosão, e ainda durante o crescimento para monitoramento do desenvolvimento dos peixes.

b) Indução à triploidia por choques de temperatura

Após a fertilização, os ovos obtidos das espécies serão equitativamente divididos e submetidos a choques de temperatura de 36, 38, 40 e 42°C para peixes de água fria e 18, 20, 22 e 24° C para peixes de água quente. Em ambos os casos, o tempo de permanência para o choque de temperatura será de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 minutos de exposição (NASCIMENTO, 2015).

Os ovos serão colocados em peneiras dispostas em aquários de 40 litros para cada tratamento (tempo e temperatura) além do controle sem variação de temperatura. Em cada peneira, será colocada a mesma gramatura de ovos, que serão tirados em tréplica em cada tempo pré-determinado dos choques, posteriormente serão colocados em estruturas para devida incubação.

Para os choques de temperaturas elevadas será utilizado aquecedor termostato digital de 100W (Watts), que regula a temperatura desejada. Já para os de água fria será utilizado gelo e cooler para manter a temperatura, acoplados com termômetro digital.

c) Indução à triploidia por choques de pressão hidrostática

Para produção de 3n por pressão, os ovos obtidos das espécies serão equitativamente divididos colocados em compartimento dentro da câmara hiperbárica (Figura 2) e submetidos a uma

determinada pressão (1, 2, 3, 4, 5 e 6 ATM – pressão atmosférica) por um dado tempo (1, 2, 3, 4, 5 e 6 minutos). Transcorrido o tempo, os ovos serão retirados e colocados em incubadoras específicas.



Figura 2. Ilustração de um modelo de câmara hiperbárica para produção de triplóide por choque de pressão (MOREIRA; HILSDORF, 2014)

1.4.4.1. Taxa de fertilização e eclosão

Para todos os testes, como forma de avaliar a taxa de fertilização e porcentagem da eclodibilidade serão utilizadas as equações abaixo (OKOMODA et al., 2018a; HASSAN et al., 2018):

$$\%Fertilização = \frac{\text{Ovos fertilizados em placa de Petri}}{\text{Número total de ovos na placa}} \times 100$$

$$\%Eclodibilidade = \frac{\text{larvas não eclodidas}}{\text{Número de ovos gerados}} \times 100$$

Determinada as taxas de eclosão, os exemplares de cada tratamento (em tréplica) passarão para caixas de 1.000 L para seu crescimento. As caixas terão aeração contínua (pedra porosa) em temperatura ambiente, com drenagens semanais para retirada de sólidos, restos de ração e fezes do fundo. A reposição da água será feita para manter o nível constante e sua qualidade quando realizada a drenagem.

As pós-larva, larvas e juvenis serão alimentados com alimento vivo (náuplios de artêmia, microalgas) e ração comercial com 40% de proteína bruta (PB), conforme a necessidade de cada espécie. Estas serão fornecidas 5 vezes ao dia e sua granulometria atenderá cada fase do animal durante o cultivo.

1.4.4.2. Determinação da triploidia

A triploidia será determinada de forma combinada (HASSAN et al, 2018) que envolve a contagem de cromossomos (OKOMODA et al., 2018a) e a caracterização eritrocitária (OKOMODA et al., 2018b) e a associação entre ambas analisadas por estudos de correlação estatística..

Após os peixes atingirem 1 mês de idade, 10 exemplares de cada tratamento serão coletados em tréplica para retirada de sangue da veia caudal com agulha calibre 30 e seringa heparinizada. Uma gota de sangue será utilizada para preparação do esfregaço (FELIPE et al., 2001; HASSAN et al., 2018; OKOMODA et al., 2018b; NORMALA et al., 2016). As lamínas serão pigmentadas e terão 10 eritrócitos analisados para cada um dos cinco blocos determinados. As lamínas serão mantidas até a confirmação do número de cromossomos para comparação dos resultados.

Depois da amostra de sangue ser retirada, solução de colchicina a 0,05% será injetada na proporção de 1ml/Kg de peixe (HASSAN et al., 2018; OKOMODA et al., 2018a) e serão devolvidos aos aquários devidamente etiquetados com seus tratamentos. Os peixes serão mantidos por 2 a 3 horas e então sacrificados com uso de água com gelo e eugenol. Confirmada a morte, terão suas brânquias e rins retirados, picados e colocados em tubo de 1,5 ml contendo 0,075 Molar (M) de KCL (cloreto de Potássio).

Com pipeta graduada, a suspensão será aspirada e transferida para um novo tubo de 1,5 ml. Após 1h, a suspensão de tecidos será centrifugada a 2.500 RCF por 10 min e o sobrenadante descartado, deixando 1 ml acima do pellet celular. A célula será ressuspensa em fixador metanol-ácido acético (3:1) por três repetição(20 minutos para cada repetição). A suspensão de células será envelhecida por três dias e posteriormente colocadas em lâminas limpas com etanol e coloradas com Giemsa a 10% (tampão fosfato 0,01 M preparado a pH 7) por 1 h.

As lamínas serão secas e fixadas com 2-3 gotas de DPX, microfotografadas e as imagens processadas usando o software Pesquisa Básica do Elemento NIS (com ampliação de 100×). Com as lâminas preparadas, as placas metafásicas de cromossomos serão contadas e anotadas para posterior análise de determinação da triploidia para cada grupo (OKOMODA et al., 2018a; HASSAN et al., 2018).

Com a triploidia analisada, as lâminas com o esfregaço de sangue serão utilizadas para contagem e caracterização dos eritrócitos dos peixes, confirmando se triplóides ou diplóides. A caracterização acontecerá pela determinação de seus tamanhos celulares e nucleares, bem como áreas, volume e proporções conforme fórmulas (FELIP et al., 2001; NORMALA et al., 2017; HASSAN et al., 2018; e OKOMODA et al., 2018b) e figura abaixo:

$$\text{Área do eritrócito} = \pi \times A \times B$$

$$\text{Volume do eritrócito} = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{A}{2}\right) \times \left(\frac{B}{2}\right)^2$$

$$\text{Relação do eixo} = \frac{\text{eixo menor}}{\text{eixo principal}}$$

$$\text{Proporção célula – área nuclear} = \frac{\text{área nuclear}}{\text{área celular}}$$

$$\text{Relação volume célula – nuclear} = \frac{\text{volume nuclear}}{\text{volume celular}}$$

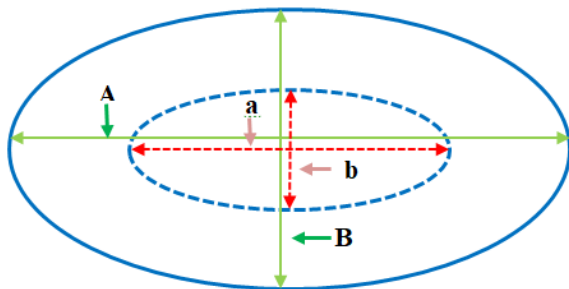


Figura 3. Esboço de eritrócito com eixo principal de célula (A), menor eixo da célula (B), eixo principal do núcleo (a) e menor eixo do núcleo (b) (HASSAN et al., 2018; NORMALA et al., 2016).

Intervalos dos valores destes parâmetros (Figura3) de peixes 3n servem para determinar as faixas 3n exclusivas. O parâmetro de maior porcentagem de células dentro de cada faixa triplóide exclusiva será a característica para identificar a triploidia dentro de cada grupo.

1.4.4.3.Determinação de possíveis deformidades

Possíveis deformidades serão avaliadas logo após os peixes serem sacrificados para confirmação da ploidia, todos exemplares identificados serão fotografados e radiografados para avaliação de deformidades ósseas. A avaliação física também será realizada para ajudar na identificação destas possíveis deformidades. Todos os dados serão anotados para posterior avaliação

1.4.4.4. Desempenho zootécnico e biometrias

Determinado o método de análise de confirmação da triploidia por sangue, os exemplares de todos os tratamentos serão submetidos à anestesia e posterior coleta de sangue por punção da veia caudal, momento em que os mesmos serão “chipados” conforme protocolo estabelecido anteriormente. As análises de sangue obedecerão ao protocolo anteriormente descrito e já estabelecido (HASSAN et al., 2018).

Após análise, os peixes 3n serão separados e distribuídos em lotes (nº de 10 exemplares) para serem cultivados, assim como os peixes 2n, em caixas de 1.000L, para avaliar se tem diferença de crescimento. Inicialmente, os peixes passarão por biometria, sendo medidos e pesados com ictiômetro e balança de precisão digital, respectivamente e também durante os 6 meses do cultivo. Ao longo do cultivo, os peixes serão alimentados com ração compatível para espécie e PB para sua idade, ofertadas 3 vezes por dia e calculada de 5 a 10 % do peso do peixe vivo.

Para a avaliação do desempenho zootécnico dos animais, os seguintes parâmetros serão determinados:

- Biomassa total = peso médio X número de peixes

- O ganho de peso Total (GPT):

$$GPT(g/dia) = biomassa\ final\ (g) - biomassa\ inicial\ (g)$$

- O ganho de peso diário (GPD):

$$GPD\ (g/dia) = \frac{[biomassa\ final\ (g) - biomassa\ inicial\ (g)]}{n^{\circ}\ de\ dias\ de\ cultivo}$$

- O consumo de Alimento:

$$CA(\%PV/dia) = 100 * \left[\frac{consumo\ médio\ diário\ (g)}{biomassa\ média\ do\ período\ (g)} \right]$$

- Conversão Alimentar Aparente:

$$CAA = \left[\frac{consumo\ total\ de\ alimento\ (g)}{ganho\ de\ peso\ no\ período\ (g)} \right]$$

- O crescimento será avaliado pela taxa de crescimento específico (CE %/dia):

$$CE\ (\%/dia) = 100 * \frac{[\ln(W_F) - \ln(W_I)]}{t}$$

em que:

CE= taxa de crescimento específico (%/dia);

ln= logaritmo natural;

W_f= peso final (g)

W_i= peso inicial (g);

t= tempo de cultivo (DIAS)

- A variabilidade de crescimento em peso (CHet) será deduzida estatisticamente do coeficiente de variação do peso (CV%), abaixo:

$$CHet = \left[\frac{\sigma}{\bar{x}} \right] * 100$$

em que:

σ = desvio padrão do peso;

$\bar{x}$ = média do peso da população da caixa.

Durante o experimento de desempenho dos peixes, a qualidade da água será avaliada quinzenalmente, sólidos totais, amônia, nitrito e nitrato com espectrofotômetro modelo YSI 9500. Semanalmente, serão aferidos temperatura, por termômetro digital; oxigênio dissolvido (OD), por oxímetro portátil de precisão; potencial hidrogeniônico (pH), por medidor digital; salinidade, por refratômetro; e transparência por disco de Secchi.

1.4.4.5. Análise estatística

Os dados serão analisados usando o software livre Rstudio 2020 e serão testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância antes da análise de variância (ANOVA). Dados em que os pressupostos de normalidade e homogeneidade não se mantiverem serão analisados por testes não paramétricos Kruskal-Wallis.

Para diferenciar as formas dos eritrócitos de diplóides e triplóides para as diferentes espécies, usaremos a regra de decisão “Tipo A” (a proporção do eixo da célula quando maior ou igual a 0,75 é considerado arredondado, enquanto que valores menores 0,75 foram considerados ovais) (OKOMODA et al., 2017; HASSUN et al., 2018). A estatística descritiva dos parâmetros de eritrócitos será pelo teste t *Student*, e a razão diplóide-triplóide, aumento ou redução do percentual, faixas triplóides exclusivas e as porcentagens de células dentro da faixa 3n exclusiva de cada parâmetro medido ou calculado serão determinadas pelo software RStudio 2020. Para identificar os parâmetros eritrocitários influentes na diferenciação de 2n e 3n será realizada a análise de componentes principais (ACP) (HASSAN et al., 2018), usando o RStudio ou o PAST.

1.5. REFERÊNCIAS

- AMBIENTAL BRASIL. Técnica reproduz peixes em extinção através de ‘barriga de aluguel’ em SP, 2016. <https://noticias.ambientebrasil.com.br/clipping/2016/01/19/122640-tecnica-reproduz-peixes-em-extincao-atraves-de-barriga-de-aluguel-em-sp.html>
- AVILA, M. C. Indução á tetraploidia em tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus* utilizando-se choque térmico. 2004 Dissertação (mestrado em Aquicultura) Centro de Aquicultura UNESP, Jaboticabal- São Paulo. <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/144121/000224725.pdf?sequence=1>

- BERTOLINI, R.M. Crescimento e aspectos reprodutivos de *Pimelodus maculatus* triploides. 2018. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Unesp –Repositório Institucional Unesp, São Paulo. [file:///C:/Users/Elite705g3Mini/Downloads/Dissertacao_RafaelaBertolini_versao_final%20\(10\).pdf](file:///C:/Users/Elite705g3Mini/Downloads/Dissertacao_RafaelaBertolini_versao_final%20(10).pdf) ; <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/180521>
- BERTOLLO, L. A. C. Cytotaxonomic considerations on Hoplias LACERDA e (Pisces, Erythrinidae). Revista Brasileira de Genética, v. 1, p. 103-120, 1978.
- BRÄMICK, U.; PUCKHABER, B.; LANGHOLZ, H-J.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Testing of triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*) under tropical pond conditions. Aquaculture Volume 137, Issues 1–4, 1, December 1995, Pages 343-353. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01104-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01104-8)
- CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of Characidium (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. Caryologia, v. 54, n. 3, p. 253-260, 2001. <https://doi.org/10.1080/00087114.2001.10589233>
- CHOURROUT, D. et al. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—potential of tetraploid fish. Theoretical and Applied Genetics, v. 72, n. 2, p. 193-206, 1986. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00266992>
- DUNHAM R. A. Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches. Wallingford, UK: CABI, 2004. https://books.google.com.br/books?id=JfA4oF1s-xYC&pg=PA17&hl=pt-BR&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false
- FELIP, A.; PIFERRER, F.; ZANUY, S.; CARRILLO, M. Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. J. Fish Biol., 2001, 58: 76-88. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00500.x>
- FONSECA, F. S.; SENHORINI, J. A.; PRADO, F.; VOLTOLINE, T. A.; FORESTI, F.P. Manipulação cromossômica de lambari (*Astyanax altiparanae*) para a obtenção de triplóides. X Reunião Científica do Instituto de pesca. 2011, p. 156-158. ftp://ftp.sp.gov.br/ftppeca/10recip/resumos/X_ReCIP_R47_156-158.pdf
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. Experientia, v. 49, n. 9, p. 810-813, 1993. <http://hdl.handle.net/11449/130469> > <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/130469>
- GIMBO, R.Y. ; SAITA, M.V.; GONÇALVES, A.F.N.; TAKAHASHI, L.S. Diferentes isolados de benzocaína na indução anestésica de Lambari-do-Rabo-Amarelo (*Astyanax altiparanae*) . Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal 9, 2008, paginas: 350 - 357. <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewArticle/1036>
- GUERREIRO, L. R.; DIAS, J. A. D.; FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; ZANONI, M.A. Incubation of eggs and larvae of pacu (*Piaractus mesopotamicus* holmberg, 1887) in israeli and woynarovich incubators. Semina: Ciências Agrárias. Vol. 32, nº 2, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n2p789>

- HAHN, L.; ENGLISH, K.; CAROSFELD, J.; SILVA, L.G.M.; LATINI, J.D.; AGOSTINHO, A.A; FERNANDEZ, D.R. Preliminary study on the application of radio–telemetry techniques to evaluate movements of fish in the Lateral canal at Itaipu Dam, Brazil. *Neotrop. ichthyol.* vol.5 no.2 Porto Alegre 2007. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252007000200003>
- HASSAN A.; OKOMODA V.T; PRADEEP P. J. Triploidy induction by electric shock in red hybrid tilapia. *Aquaculture* 495 (2018) 823-830. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.074>
- HOSEINI, S.M.; RAJABIESTERABADI, H.;TARKHANI, R. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. *Aquaculture Research*, 2013, Volume 46, Issue 2. <https://doi.org/10.1111/are.12188>
- HUERGO, G. M.; ZANIBONI-FILHO, E. Triploidy induction in Jundiá, *Rhamdia quelen*, through hydrostatic pressure shock. *Journal of Applied Aquaculture*, v. 18, n. 4, p. 45-57, 2008. https://doi.org/10.1300/J028v18n04_04
- KARAMI, A. CHRISTIANUS, A.; ISHAK, Z.; COURTENAY, S.C.; SYED, M.A.; AZLINA, M.N.; NOORSHINAH, H. Effect of triploidization on juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquacult. Int.*, 18, 2010. p: 851-858. DOI 10.1007/s10499-009-9307-x
- LACERDA, S. M. S. M.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A. CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, T. D.; RESENDE, R. R; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and *in vitro* propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *General and Comparative Endocrinology* 192, p. 95-106, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.013>
- 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*. V. 5, Issue, p. 1-9, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010740>
- LEGENDRE, M.; SLEMBROUCKA, J.; SUBAGJAB, J.; KRISTANTO, A.H. Ovulation rate, latency period and ova viability after GnRH-or hCG-induced breeding in the Asian catfish *Pangasius hypophthalmus* (Siluriformes, Pangasiidae). *Aquat. Living Resour.* 13 (2000) 145–151. https://www.researchgate.net/publication/229225582_Ovulation_rate_latency_period_and_ova_viability_after_GnRH-or_hCG-induced_breeding_in_the_Asian_catfish_Pangasius_hypophthalmus_Siluriformes_Pangasiidae
- LIMA, M.C.C. Desenvolvimento embrionário e larval de *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachipomus* e do híbrido tambatinga. 2014. Dissertação (mestrado em ciência animal) Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/4053/2/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Mayanny%20Carla%20de%20Carvalho%20Lima%20-%202014.pdf>
- LIU, S.; LIU, Y.; ZHOU, G.; ZHANG, X. LUO, C.; FENG, H. HE, X.; ZHU, G.; YANG, H. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture* 192, 171-186. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00451-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00451-8)
- LUCENA, C.A.S.; CALEGARI, B.B.; PEREIRA, E.H.L.; DALLEGRAVE, E. O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*. Nº 105 – ISSN 1808-1436 Londrina, 28 de Março de 2013.

https://www.researchgate.net/publication/267026511_O_uso_de_oleo_de_cravo_na_eutanasia_de_peixes

- MARCON, L.; FREITAS, V.R.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; BENJAMIN, L.A. Growth hormone on ovarian morphology of lambaris (*Astyanax bimaculatus*) after induced spawning. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.49:08, e20180478, 2019. <https://www.scielo.br/pdf/cr/v49n8/1678-4596-cr-49-08-e20180478.pdf> ; <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180478>
- MARTINS, Leandro Freitas. Temperatura pós choque e a produção de tetraploides em *Astyanax altiparanae*. 2019. 28p. Monografia (Graduação em Engenharia de Aquicultura) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS. <http://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/bitstream/prefix/2289/1/LeandroFreitasMartins.pdf>
- MARTINS, G.H.; MAZOTI, J.I.; BERCINI, V.M.; HONORATO, C.A. Tempo de indução e recuperação à anestesia do eugenol para patinga (*Piaractus brachypomus*). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. v. 17, n. 4 (2014) <https://doi.org/10.25110/arqvet.v17i4.2014.5024>
- MOREIRA, H.L.M.; HILSDORT, A. W.S. O que é peixe triploide e o quanto esta técnica pode ser útil no melhoramento genético. *Panorama da aquicultura*, nº 142, 2014. <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-que-e-peixe-triploide-tecnica-util-no-melhoramento-genetico/>
- WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais. FAO/CODEVASF/CNPQ, 1983. <http://www.aterpesca.org.br/wp-content/uploads/2017/08/A-propaga%C3%A7%C3%A3o-artificial-de-peixes-de-aguas-tropicais.pdf>
- MOTA, C. S. Desenvolvimento de tecnologia de cultivo para peixes nativos da bacia do rio Uruguai. Relatório de estágio curricular obrigatório apresentado à universidade federal de Goiás, 2013. https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/186/o/Carolinne_Silva_da_Mota_-_Desenvolvimento_de_Tecnologia_de_Cultivo_para_Peixes_Nativos_da_Bacia_do_Rio_Uruguai.pdf
- NASCIMENTO, N.F. Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*). 2015. Dissertação (mestrado em Aquicultura) Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal- São Paulo. [file:///C:/Users/Elite705g3Mini/Downloads/Dissertacao_Nivaldo%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Elite705g3Mini/Downloads/Dissertacao_Nivaldo%20(2).pdf)
- 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*, v. 471, p. 163-171, 2017. ISSN 0044-8486. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2017.01.007](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.007)
- NORMALA, J.; MOHD, A. A.; ABOL, M. A. B.; NUR, A. A.; KHOR, W.; SHAHREZA, M.S. It is all in the Blood: Erythrocyte Characterization of Triploid and Diploid African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* Volume 11 (6): 425-431, 2016. DOI: [10.3923/jfas.2016.425.431](https://doi.org/10.3923/jfas.2016.425.431)
- NORMALA, J.; MOHD, A. A.; ABOL, M. A. B.; NUR, A. A.; KHOR, W.; OKOMODA, V.; SHAHREZA, MD-S. Morphometric variations between triploid and diploid *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) *Croatian Journal of Fisheries*, 2017, 75, 113-121. DOI: [10.1515/cjf-2017-0015](https://doi.org/10.1515/cjf-2017-0015)

- OKOMODA, V. T.; KOH, I. C. C.; HASSAN, A.; AMORNSAKUN, T.; SHAHREZA, M. S. Performance and characteristics of the progenies from the reciprocal crosses of *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture* 489 (3), 2018a, p. 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.011>
- OKOMODA, V. T.; KOH, I. C. C.; HASSAN, A.; AMORNSAKUN, T.; KHAIRUL, A. B. K.; RAJAMAD, R. Y.; SHUHAIMI, A. D.; SHAFIQ, M. R.; SHAHREZA, M. S. Erythrocyte characteristics of the progenies of pure and reciprocal crosses of *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Comp. Clin. Pathol.* 2018b, 27, 301-312. DOI: [10.1007/s00580-017-2589-x](https://doi.org/10.1007/s00580-017-2589-x)
- OKOMODA V. T.; KOH, I. C. C.; HASSAN, A.; AMORNSAKUN, T.; SHAHREZA, M. S. Cell Axis Ratio a Standardized Approach for Normal Erythrocyte Shape Determination in Fishes. 2017, *Journal of Fisheries and Aquatic Science* ISSN 1816-4927 DOI: [10.3923/jfas.2017.284.288](https://doi.org/10.3923/jfas.2017.284.288)
- OLIVEIRA, A. Avaliação de três anestésicos para espécies de peixes reprodutores utilizando o método de imersão. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) Universidade federal de Viçosa- MG, Brasil, 2009. <https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2230/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ORBOLATO, T.S.; GIRARDI, L.; AQUINO SILVA; M.R.; FIORINI, M.P. Reprodução induzida do lambari, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus,1758) . X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 212- 215, 2006. http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2006/inic/inic/02/INIC0000781_ok.pdf
- PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J.-C.; FLAJSHANS, M. HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, v. 293, n. 3, p. 125-156, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.036>
- QUEROL, M.V.M; PESSANO, E. F.C.; BRASIL, L.G.; CHIVA, E.Q.; GALHA, T.S. Tecnologia de Reprodução de Peixes em Sistemas de Cultivo: Indução hormonal através do extrato hipofisário da Palometa. ISBN 978-85-63337-30-6. 81 p.; PDF – Distribuição Digital Núcleo de Pesquisas Ictiológicas, Limnológicas e Aquicultura da Bacia do Rio Uruguai. Fundação Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguai. 2013. 1. Reprodução de Peixes - 2. Extrato hipofisário - 3. Palometa - 4. Piscicultura – UNIPAMPA. Abril/2013. 81 p. <https://sites.unipampa.edu.br/nupilabru/files/2013/08/LIVRO-NUPILABRU1.pdf>
- RODRIGUES, R.B.; MELO, I.W.A.; ROCHA, J.D.M.; SILVA, T.C.; BRIDI, V.R.C.; SIGNO, A.; BITTENCOURT, F.; BOSCOLO, W.R. Induction time of anesthesia and recovery of benzocaine to patinga (*Piaractus mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*). *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* (v.10, n.3) p. 364 – 373, jul - set (2016). DOI: [10.5935/1981-2965.20160030](https://doi.org/10.5935/1981-2965.20160030)
- SAKABE, R.; PÁDUA, S. B. de; PILARSKI, F.; DIAS NETO, J.; CLAUDIANO, G. da S.; CHAGAS, E. C. Alterações no tromboleucograma de tambaqui (*Colossoma macropomum*) Sob efeito da anestesia com benzocaína e óleo de cravo. 2010. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/878014/alteracoes-no-tromboleucograma-de-tambaqui-colossoma-macropomum-sob-efeito-da-anestesia-com-benzocaina-e-oleo-de-cravo>.

- SAMPAIO, E.V; SATO, Y. Aspectos reprodutivos de *leporinus piau* fowler, 1941 (*Osteichthyes, anostomidae*) da bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida. Ciência animal brasileira, vol. 10 nº 1, 2009. <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/4264>
- SATO, L.S. Indução à triploidia no tambaqui *colossoma macropomum*, pacu *piaractus mesopotamicus* e o respectivo híbrido Tambaçu. 2015. Dissertação (mestrado em Aquicultura) Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP. <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/132691/000854711.pdf?sequence=1>
- SILVA, M; MATOSO, D.A. LODWIG, L. A. M.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; RTONI, R. F. Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguazu basin, southern Brazil. Environmental biology of fishes, v. 91, n. 3, p. 361-366, 2011. DOI [10.1007/s10641-011-9794-2](https://doi.org/10.1007/s10641-011-9794-2)
- SIMÕES, L.N. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Sci., Anim. Sci. [online]. 2012, vol.34, n.2, pp.175-181. ISSN 1807-8672. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i2.13022> ; https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1807-86722012000200011&script=sci_abstract&tlng=pt
- SILVA, F. S. D. et al. Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes)(Quoy & Gaimard, 1824). Aquaculture, v. 272, p. S110-S114, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.006>
- SOUZA, T.G. Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal em piau-três-pintas, *Leporinus friderici*, Bloch 1794. 2015. Tese (Doutorado em Aquicultura) Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, Jaboticabal-SP. <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/134052/000855133.pdf?sequence=1>
- STREIT JÚNIOR, D.P.; POVH, J.A.; FORNARI, D.C.; GALO, J.M.; GUERREIRO, L.R.J. MELANIE, D.O.; GODOY, D.L.C. Recomendações Técnicas para a Reprodução do Tambaqui. Documento 212, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, abril de 2012. ISSN 0104-866X. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/83462/1/Doc-212-RecomendacoesTecnicasReproducaoTambaqui.pdf>
- TIWARY, B. K.; RAY, A.K. Alterations in air-sac and skeleton of triploid Heteropneustes fossilis. Journal of fish biology, v. 64, n. 1, p. 268-272, 2004. DOI: [10.1111/j.1095-8649.2004.00287.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00287.x)
- VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. Pesq. agropec. bras. v.43 n.8 Brasília ago. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800017>
- WEBER, G. M.; HOSTUTTLER, M. A.; SEMMENS, K. J.; BEERS, B. A. Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Canadian journal of fisheries and aquatic sciences, v. 72, n. 10, p. 1443-1449, 2015. ISSN 0706-652X. <https://pdfs.semanticscholar.org/2f76/c6fee320e7d855f1af068f86877db0c5c7d4.pdf>
- WEISS, L. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Survival of diploid and triploid *Rhamdia quelen* juveniles in different ammonia concentrations. Aquaculture, v. 298, n. 1, p. 153-156, 2009. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2009.10.010](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.010)

- WEISS, L. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Survival of diploid and triploid *Rhamdia quelen* juveniles under different oxygen concentrations. *Journal of Applied Aquaculture*, v. 22, n. 1, p. 30-38, 2010. <https://doi.org/10.1080/10454430903539137>
- YOSHIZAKI G, LEE S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. *Stem Cell Research* 29, p. 103-110, 2018 . Doi: [10.1016/j.scr.2018.03.015](https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.015)
- Harvey B; Carolsfeld J. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: IDRC, 1993. p.144. Disponível em:<<http://www.nzdl.org/gsdldmod?e=d-00000-00---off-0hdl-00-0---0-10-0---0---0direct-10---4-----0-11--11-en-50---20-about---00-0-1-00-0--4---0-0-11-10-0utfZz-8-00&cl=CL1.9&d=HASH016eeb3fd93e4e349784808a&x=1> . Acesso em 10-03/2020.

2. CARACTERIZAÇÃO, ISOLAMENTO E CULTIVO DE ESPERMATOGÔNIAS E OOGÔNIAS DE PEIXES

2.1. Introdução

As células germinativas (espermatogônias e oogônias) vêm sendo bastante estudadas e aplicadas em biotécnicas reprodutivas. Estas células germinativas primordiais (CGPs) são formadas pelos anexos embrionários, responsáveis pela formação dos gametas e são precursoras das espermatogônias e oogônias (NÓBREGA et al., 2010).

Estudos de transplante em peixes, usando espermatogônias foram realizados em truta arco-íris e demonstraram a existência de células-tronco espermatogoniais (CTEs) nestes organismos (OKUTSU et al. (2006). Estas espermatogônias vêm sendo usadas para o transplante singênico /alógênico e xenogênico em peixes (YOSHIZAKI; LEE, 2018), em particular as espermatogônias do tipo A. Estas células podem tornar-se células pluripotentes (OATLEY; BRINSTER, 2012; THOMA et al., 2011), e podem substituir células-tronco embrionárias (LACERDA et al., 2013) e apresentam-se em maior quantidade que as CGPs, independente da sua idade e ciclo reprodutivo (YOSHIZAKI et al., 2012).

Para que células-tronco (espermatogônias e oogônias) sejam isoladas, caracterizadas, cultivadas e posteriormente marcadas, faz-se necessário que animais doadores tenham suas gônadas retiradas post mortem ou por procedimento cirúrgico (YOSHINAGA, 2018). As gônadas dos animais doadores são retiradas e posteriormente dissociadas por digestão enzimática, separadas e selecionadas em gradientes de densidade descontínuo (LACERDA et al., 2010; LACERDA et al., 2013). Após seleção, a solução proveniente da digestão passa pelo plaqueamento diferencial (SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2010; LACERDA et al., 2013; DIAS, 2015) que proporciona a eliminação de outras células indesejáveis para que possam ser cultivadas.

O cultivo das células é realizado em incubadoras adequadas para manutenção de temperatura sob leve agitação por algumas horas, cujo objetivo é aumentar sua densidade celular (DIAS, 2015). Em seguida, estas células são pigmentadas e avaliadas quanto à viabilidade para posterior quantificação em câmara de Neubauer (LACERDA et al., 2008), com isso as células podem ser mais bem identificadas e transplantadas para o receptor.

As espécies elencadas neste estudo apresentam grande potencial na aquicultura seja de corte ou ornamental, porém a oferta contínua de exemplares é bastante reduzida pela dificuldade de reprodução em cativeiro. Algumas espécies são comercializadas, entretanto a produção de seus descendentes muitas vezes só é possível por indução em um período curto no ano com base no período reprodutivo. Ainda usando esse procedimento, não é garantido que ocorra a liberação natural de gametas ou quando extrusados e a quantidade de ovos é bastante reduzida. Em outras espécies, como o pirarucu (*Arapaima gigas*) só é possível a reprodução com manejo simulando variáveis ambientais do meio natural, porém também não é garantido que os peixes venham a se reproduzir. Além do valor econômico agregado, outro ponto favorável para utilização destas espécies, está na redução do impacto ambiental, pois reduziria as capturas de exemplares jovens direto da natureza para serem vendidos, tornando este trabalho de suma importância e com inestimável contribuição para o meio ambiente.

Algumas espécies estão no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, (ICMBio/MMA, 2018). Elas sofrem principalmente com a redução do seu habitat e pesca de subsistência, pois alguns destes animais fazem parte do cardápio alimentar como tradição dos povos ribeirinhos, nos rios aos quais estes peixes pertencem. Uma ação que traga soluções para produzir estas espécies e devolvê-las, em parte aos seus rios de origem tem uma grandeza inquestionável, tendo como consequência de sua produção, a preparação de um plantel devidamente registrado e “chipado” para reprodução em cativeiro e comercialização por parte de produtores ornamentais, por apresentarem maior valia.

Dentre as espécies marinhas com potencial interesse comercial, podem ser destacados dois Tunídeos que merecem especial atenção e são comumente encontrados no litoral potiguar, a Albacora laje (*Thunnus albacares*) e a Albacora bandolim (*Thunnus obesus*). Tais exemplares, podem servir como modelos em estudos em tunídeos brasileiros, uma vez já existirem protocolos de isolamento, cultivo e criopreservação de células tronco em tunídeos asiáticos (BAR et al., 2016).

Ao propor trabalhar nessa direção, além de estabelecer protocolos de desenvolvimento de pesquisa de biotecnologia aplicada a reprodução destas espécies, pensaremos no ecossistema e promovendo as espécies escolhidas. Ressalte-se que muitos desses peixes são capturados muitas vezes de forma clandestina, vendidos para fora do país e depois revendidos no mercado nacional

sem que o nosso país tenha controle, deixando de explorá-los de forma sustentável, perdendo a fauna e recursos que poderiam contribuir para sua proteção, através do mercado legal e responsável.

1.2. Objetivos

Geral

- Estabelecer protocolo para isolamento e cultivo de células germinativas de peixes de interesse comercial

Específicos

- Descrição histológica e estereológica de espermatogônias e oogônias dos peixes doadores;
- Montar os protocolos de seleção e marcação de espermatogônias e oogônias dos peixes doadores;
- Estabelecer protocolo para micromanipulação de embriões e de células embrionárias dos peixes doadores;
- Estabelecer protocolo para cultivo de células germinativas dos peixes doadores;

1.3. Material e métodos

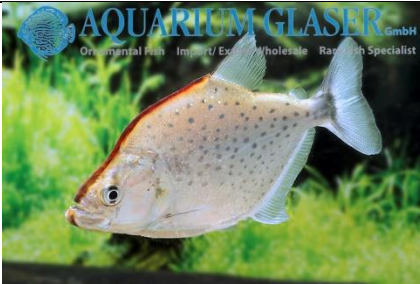
1.3.1. As espécies

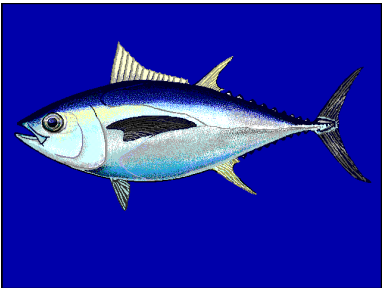
Os animais doadores jovens e adultos serão peixes provenientes de pisciculturas comerciais registradas, instituições de pesquisa ou empresas parceiras. As espécies escolhidas estão descritas abaixo:

Quadro 3. Espécies de peixes listadas para serem doadores nos trabalhos realizados neste projeto e em outros como demonstrado no Programa BioReP. * Peixes que aparecem na Categoria de risco de extinção e critérios como em perigo (EM) A4c. (Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, ICMBio/MMA, 2018.)

Espécie nome científico	Nome comum	Número		Origem
		M	F	
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>  https://portuguese.alibaba.com/product-detail/osteoglossum-bicirrhosum-fish-107449452.html	Aruanã	10	10	Piscicultura Tanganyika

<i>Arapaima gigas</i>  https://br.pinterest.com/pin/852517404432019671/	Pirarucu	10	10	Piscicultura DNOCS
<i>Astronotus ocellatus</i>  https://pt-br.facebook.com/pg/Piscicultura-Oscar-Fish-1081120118625634/posts/	Oscar	30	20	Piscicultura Tanganyika
<i>Utiaritchthys sennaebragai</i>  http://www.fishbiosystem.ru/CHARACIFORMES/Characidae/Utiaritchthys.html	Pacu-piranha	20	20	Piscicultura Tanganyika
<i>Myleus micans</i>  https://aquass.ru/product/myleus-micans/	Pacu-Azul	20	20	Piscicultura Tanganyika
<i>Serrasalmus geryi</i>	Piranha de Gery	20	20	Piscicultura Tanganyika

 https://www.aquariumglaser.de/en/fish-archives/serrasalmus-geryi-2/				
<i>Leporinus octomaculatus</i>  copyright by www.AAA-Exotics.com	Piau	20	20	Piscicultura Tanganyika
<i>Conorhynchos conirostris</i> *  Foto: Tiago Casarim Pessali (ICMBio/MMA, 2018).	Pirá-tamanduá	20	20	Piscicultura Tanganyika
<i>Aguarunichthys tocantinsensis</i> *  Foto: Fishbase (ICMBio/MMA, 2018).	Jundiá	20	20	Piscicultura Tanganyika
<i>Kalyptodoras bahiensis</i> *  Foto: Oswaldo Takeshi Oyakawa (ICMBio/MMA, 2018).	Peracuca	20	20	Piscicultura Tanganyika

<i>Panulirus argus</i>  https://www.sealifebase.se/summary/Panulirus-argus.html	Lagosta vermelha	10	10	Captura na pesca
<i>Thunnus albacares</i>  https://pt.wikipedia.org/wiki/Thunnus_albacares	Albacora laje	20	20	Captura na pesca
<i>Thunnus obesus</i>  https://pt.wikipedia.org/wiki/Thunnus_obesus#/media/Ficheiro:Thobe_u0.gif	Albacora bandolim	20	20	Captura na pesca

Excepcionalmente, como uma forma de avaliar as espécies receptoras como possível modelo para o transplante de espermatogônias a partir de outro indivíduo filogeneticamente distintas, células de lagostas vermelhas (*Panilurus argus*) serão isoladas e cultivadas similar aos peixes para posterior transplante. Metodologia semelhante foi realizada por pesquisadores ao transplantar células de ratos, rãs-touro e peixes filogeneticamente distantes em peixes (LACERDA, 2010). As espécies a serem utilizadas são lagostas da família Palinuridae distribuídas ao longo da costa norte e nordeste e muito presente no litoral do Rio Grande do Norte e do Ceará, também serão coletadas junto a pescadores artesanais licenciados da região.

A solicitação de todas as licenças cabíveis (ICMBio, SisGen, Ibama) para captura, transporte, reprodução e cultivo destes organismos será realizada pelos professores responsáveis da Universidade antes da execução do projeto, bem como a solicitação junto ao CEUA que deve ser anterior às outras, conforme a legislação.

A piscicultura Tanganyika, devidamente registrada, é parceira do Programa e irá contribuir na aquisição, capturas e transporte das espécies do meio natural até o setor de aquicultura da UFERSA. Os exemplares a serem estudados, após captura irão permanecer em quarentena no setor de aquicultura em ambientes controlados para o bem-estar dos animais, em água com qualidade e aeração constante.

1.3.2. Caracterização das células germinativas dos doadores

Serão utilizados machos (n=03) e fêmeas (n=03) de cada espécie, retirados dos tanques de contenção de 15 mil litros com auxílio de puçá, transferidos e mantidos em caixas de água de 1.000L por 24 horas em condições abióticas com fotoperíodo natural no setor de aquicultura. Os exemplares serão capturados com auxílio de puçá e colocados na caixa de 20L para anestesia, com exceção do pirarucu que não é feita na água, e será compatível para cada espécie conforme a literatura. Confirmada a anestesia profunda, os peixes serão medidos e pesados e passarão por cirurgia para retirada das gônadas.

Cada peixe anestesiado será contido com auxílio de suporte em forma de trapézio acolchoado e úmido para que não sejam causados danos à pele do animal. Será inserido catéter na boca, para que durante o procedimento cirúrgico por via oro-branquial, os peixes se mantenham com oxigenação. A recuperação dos organismos vai acontecer com uso de água corrente após o termino da cirurgia. O procedimento cirúrgico será realizado com auxílio de carrinho móvel equipado com materiais necessários para essa conduta (WEISSE et al., 2002)

A incisão será ventral no sentido craniocaudal (na linha alba) e terá uma ou mais fileiras de escamas ao logo do seu local previamente retiradas com pinça estéril. Em sequência proceder-se-á a antissepsia da região a qual será coberta com campo cirúrgico esterilizado. Uma incisão por bisturi e posteriormente, a cavidade abdominal será seccionada com auxílio de tesoura até atingir a membrana do peritônio que envolve os órgãos. Com a cavidade celomática aberta, as gônadas serão localizadas, pinçadas e removidas de forma suave e cautelosa para não danificar nenhum outro órgão.

Após a gonadectomia, os peixes serão suturados (RESENDE, 2015) com fios de nylon (4-0) e alocados na caixa de recuperação com água e aeração continua. Ao se recuperarem serão transferidos para caixas de 1.000L para serem observados por 30 dias após cirurgia e depois devolvidos nos tanques de cultivo. O objetivo de manutenção dos peixes vivos e para posterior retirada de sangue para utilização no cultivo de células germinativas durante os trabalhos.

Os ovários e testículos serão retirados, medidos e pesados, posteriormente fragmentados em seções longitudinais e aplicado o método de rotina para inclusão em parafina para avaliação em microscopia de luz e imuno-histoquímica e em glicerol metracrilato para avaliação de microscopia

de luz conforme protocolo (DIAS, 2015). Cortes histológicos serão realizados com micrótomo a 3,0 µm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), para microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos fixados em glutaraldeído 4% e pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% com sacarose.

1.3.3. Caracterização morfológica e estrutural das gônadas

Os testículos e ovários serão analisados anatomicamente e microscopicamente para caracterização morfológica e estrutural, quanto ao arranjo tecidual e às características e proporções de suas células, com foco na presença e morfologia das espermatogônias e oogônias primárias. Os parâmetros morfológicos das células como a quantidade e a localização da cromatina no núcleo, e morfométricos, como o diâmetro celular e nuclear, serão caracterizados para diferenciar as distintas células germinativas. As comparações dos seus formatos serão através dos trabalhos já realizados (DIAS, 2015; LEAL et al., 2009).

O diâmetro celular médio das espermatogônias e oogônias, primárias e secundárias e das células de Leydig (testículos) serão medidos em 30 células de cada tipo para sua melhor caracterização. Através da análise estereológica, o percentual volumétrico de cada componente testicular e/ou ovariano e a porção de tecido ocupado por células primárias alvo serão quantificados. Para avaliação, cinco campos de cada corte histológico serão digitalizados e aumentados até 1.000 vezes para comparação das suas zonas: anterior, média e posterior, utilizando o software de domínio público ImageJ.

1.3.4. Análise estereológica e morfométrica das espermatogônias e oogônias dos peixes e lagosta doadores

O volume médio das células-tronco primárias de interesse será obtido com uso de micrômetros cúbicos do volume nuclear e da proporção (%) entre núcleo e citoplasma (DIAS, 2015; LEAL et al., 2009). O volume nuclear será estimado usando o diâmetro nuclear médio dos núcleos que apresentava contorno mais arredondado possível. Cem pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células primárias serão contados para cada animal, usando o software ImageJ com aumento de 1.000 vezes o campo de observação.

Para os cálculos dos volumes nuclear, do citoplasma espermatogonial e oogonial médio serão utilizadas as seguintes fórmulas (DIAS, 2015):

$$\text{Volume nuclear: } 4/3\pi R^3, \text{ onde } R = \text{diâmetro nuclear}/2$$

$$\text{Volume citoplasmático: } \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$

$$\text{Volume celular: volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

Portanto, com base nos dados de volume (em micrômetros cúbicos) das células primárias, da sua proporção volumétrica (%) nas gônadas e do volume total (mL) ocupados por estas células, o número de espermatogônias e oogônias primárias serão calculados para cada gônada.

1.3.5. *Análise estatística*

Serão realizados testes de normalidade e todos os valores médios serão calculados e posteriormente verificados com os devidos testes de comparação entre as médias, com uso do software aberto *Rstudio* 2020.

1.3.6. *Avaliação da fase e subfase reprodutiva dos animais analisados*

As avaliações da fase e subfase no ciclo reprodutivo dos animais serão determinadas utilizando a mesma amostra anterior para análise morfométrica e estereológica. As avaliações seguirão o protocolo já estabelecidos (BROWN-PETERSON et al., 2011), a qual utiliza critérios morfológicos e histológico para distinguir as fases e as subfases reprodutivas em peixes teleósteos.

Os fragmentos anterior, posterior e médio das gônadas serão fixados por imersão em líquido de Bouin, inclusos em parafina, e os cortes 3µm serão corados com uso de Hematoxilina-Eosina (HE). Fragmentos também serão fixados em glutaraldeído 4% a 0,05M e inclusos em glicerol metacrilato, corados a 2 µm e corados com ácido periódico + hematoxilina férrica + metanol Yellow. Imagens dos tecidos serão analisadas com microscópio e fotografadas para posterior análise.

1.3.7. *Obtenção e isolamento das espermatogônias dos peixes doadores*

As células germinativas serão obtidas através da digestão enzimática conforme protocolos descritos anteriormente (LACERDA et al., 2006, 2008, 2010, 2013; DIAS, 2015).

a) Aclimação dos animais

Os exemplares serão retirados dos tanques e alocados em caixa de água de 2.000L com aeração e filtro para manter a qualidade da água. O local para aclimação será controlado com avaliação de parâmetros ambientais como temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido, por 5 dias e conferidos a cada 24 horas. Transcorrido este período, a temperatura será reduzida 2°C por dia até atingirem 20°C e mantidas por 5 dias. A finalidade desse procedimento é aumentar a autorrenovação espermatogonial e induzir a apoptose de células germinativas mais avançadas nas gônadas (ALVARENGA; FRANÇA, 2009; DIAS, 2015), em especial as espermatogônias e oogônias.

b) Digestão enzimática dos testículos e ovários

Animais aclimatados serão anestesiados com dose letal de anestésico já descrita para as espécies a serem usadas. Os exemplares terão seus dados biométricos registrados, como: sexo, peso

e tamanho. Os exemplares serão aspergidos em álcool 70% por um curto período para manter as condições assépticas necessárias e posteriormente, por punção da veia caudal, seu sangue será coletado para produção de soro para o cultivo celular e outro uso posterior. O soro é usado por promover a mitose de células embrionárias.

A coleta do soro será efetuada com seringa de 5 mL e lavada com solução anticoagulante (Hepamax-S, heparina sódica, 5.000 U.I./mL). Após isso serão transferidos para tubos Falcon, de 15 mL e conservados a 4°C. Durante 30 minutos a 4°C será centrifugado a 3200 g (RCF), o sobrenadante colhido e transferido para outros tubos e o soro será incubado a 4°C e realizado uma nova centrifugação para retirada de restos de hemácias e depois filtrado (filtro 0,22 Millipore) e estocado em alíquotas de 1 ml a -20°C. Para seu uso uma nova centrifugação será necessária e o sobrenadante adicionado ao meio de cultivo (DIAS, 2015).

Em seguida os exemplares serão colocados em suporte em forma de trapézio em decúbito ventral e será realizado corte da papila urogenital no sentido posterior-anterior com tesoura ponta fina e terão cuidadosamente suas gônadas retiradas. Para digestão enzimática, as gônadas serão processadas conforme protocolo estabelecido (LACERDA et al., 2006, 2008, 2010, 2013; DIAS, 2015).

Usando a capela de Fluxo laminar, as gônadas serão lavadas em solução PBS 0,1 M + Antibióticos (AB, penicilina/ estreptomicina – 10000U/10 mg/mL -500 µL) + Anfotericina (Anf – 1 mg/mL -125 µL) + gentamicina (Gent – 50 mg/mL – 50 µL), pesadas e postas em becker estéril contendo solução hipoclorito 0,5% durante dois minutos (PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011). Posteriormente, realizada a mesma lavagem anteriormente descrita e transferidos para placa de Petri contendo solução salina balanceada de Hanks – (HBSS) + AB + Anf + Gent, cortados em pequenos fragmentos e lavados até 5 vezes em HBSS para retirada do excesso de sangue, ovas e sêmen.

Posteriormente, 1 g dos fragmentos serão transferidos para garrafa de cultura estéril de 25 cm² contendo solução de collagenase (Tipo IA) em meio de cultura D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium;) na concentração de 2 mg/mL, esterilizado em filtro 0,22µm (Millipore) contendo AB + Anf + Gent (500 µL; 125 µL; 50 µL, respectivamente) e incubados sob agitação com Shaker (190 RPM) por 1 hora a 25°C. Transcorrido o tempo, será adicionada 1% de DNase I para reduzir a viscosidade do meio e facilitar a dispersão das células que foram incubadas por mais 3 horas sob a mesma agitação. Após a incubação, pequenos fragmentos restantes serão separados da suspensão celular e ressuspensos em solução de tripsina a 0,25% e 1% de DNase I e dissociados mecanicamente com auxílio de pipeta pasteur.

Terminada a agitação por 20 minutos, a ação da tripsina será interrompida pela adição de 10% (v/v) de soro fetal bovino (SBF). A suspensão celular separada e as substâncias serão juntadas

à tripsina e 1% de DNase I para facilitar a filtração com peneira de nylon com poros de 70 µm e 40 µm, respectivamente em tubo cônico (tipo Falcon 50 mL).

O filtrado será centrifugado por 10 minutos (100g/RCF) a 25°C e após seu término o sobrenadante será retirado cuidadosamente. As células serão ressuspensas em 400 µL de D-MEM/F-12, suplementado com 0,75% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) e transferidos para tubo cônico (tipo Falcon 15 mL) para centrifugação por 10 minutos (100g/RCF) a 25°C. Novamente o sobrenadante será descartado cuidadosamente e as células ressuspensas em 100µL de D-MEM/F-BSA 0,75%.

c) Separação por gradiente de Percoll, plaqueamento diferencial por adesão e seleção das células germinativas.

Após dissociação e digestão enzimática, as células serão fracionadas através de gradiente descontínuo de densidade, utilizando Percoll para obtenção de maior concentração de espermatogônias ou oogônias na suspensão a ser cultivada *in vitro*. Para o gradiente de Percoll é preciso primeiramente preparar uma solução estoque na proporção de 1:9, sendo 1 parte de DMEM concentrado 10 vezes (DMEM 10X) complementado de 0,01 g/L de antibiótico, 6mM de HEPES; pH 7,4; 280-320 mOsm/Kg de H₂O; e 9 partes de Percoll. O dMEM 10 x é preparado diluindo 100 mL de água ultra bidestilada do sistema MilliQ, na concentração necessária para fazer 1 litro, filtra em seguida em membrana com poros de 0,22µ e estocado em temperatura entre 4 a 6°C, por no máximo 15 dias.

Para obtenção da solução homogênea nas concentrações 10, 20, 30 e 40%, a seguinte mistura será realizada (DIAS, 2015):

- 40% = 0,6 mL da solução estoque + 0,9 mL de D-MEM-BSA 0,75%;
- 30% = 0,4 mL da solução estoque + 1,1 mL de D-MEM-BSA 0,75%;
- 20% = 0,2 mL da solução estoque + 1,3 mL de D-MEM-BSA 0,75%;
- 10% = 0,1 mL da solução estoque + 1,4 mL de D-MEM-BSA 0,75%;

As concentrações serão dispostas com auxílio de pipeta com ponteira 1 mL na parede do tubo cônico (tipo Falcon 15 mL) cuidadosamente da maior concentração para a menor (40 para 10%). A suspensão celular será depositada no topo da coluna de Percoll 10% e centrifugada por 30 minutos (800g) a 25°C.

d) Avaliação da metodologia de separação por gradiente de Percoll

As bandas formadas pelo gradiente de Percoll serão analisadas histologicamente para avaliar a eficiência da metodologia de separação. As bandas serão coletadas com pipetas isoladamente e colocadas em tubos Falcon de 15 mL, lavadas em DMEM/F12- BSA 0,75% centrifugadas e o pellet

formado fixado em glutaraldeído a 2,5% a 4°C. Após 20 horas, serão centrifugadas (14.000g/RCF) por 15 minutos, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% com sacarose, contrastados em bloco com uranila e incluídos com a técnica de inclusão em resina *Spurr* (DIAS, 2015).

Cortes serão semifinos (450 nm) feitos e corados com azul de toluidina. Cortes ultrafinos (70nm) serão realizados com micrótomos e coletados em tela de cobre, corados com acetato de uranila e nitrato de chumbo. Para análises dos cortes semifinos, serão realizadas fotomicrografias e os ultrafinos em microscópio eletrônico. O objetivo é avaliar qual banda de Percoll tem maior concentração de células tronco (espermatogônias e oogônias).

d) Plaqueamento diferencial por adesão das células germinativas após centrifugação com Percoll

Paralelamente à avaliação histológica, o plaqueamento diferencial será realizado para enriquecer o meio com as células das duas camadas com maior número de células-alvo, ele também permitirá que células somáticas e germinativas mais avançadas e indesejadas sejam eliminadas. Em alta concentração durante o cultivo, estas células indesejadas dificultam a proliferação, o desenvolvimento e a sobrevivência de espermatogônias e oogônias primárias.

Retira-se as duas bandas cuidadosamente com pipeta de *Pasteur* e coloca-se em tubo de Falcon 15 mL e centrifugado por 10 minutos (400 / RCF) a 25°C. O sobrenadante será descartado e o Pellet ressuspensionado em 1mL de meio DMEM/F suplementado com 10% de SBF+ AB, Anf e Gent. As células serão contadas seguindo o protocolo de contagem e viabilidade celular, através do método de exclusão por Azul de Tripan e com uso de câmara de *Neubauer* (LACERDA, 2008, 2010).

Posteriormente a solução será transferida para garrafa estéril de 75 cm² em concentração dada e acrescentado o meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SBF e AB + Anf + Gent para completar o volume para 25 mL e cultivar em incubadora com 5% de CO₂ a 25°C por 14 a 17 horas.

Com uso de microscópio invertido, será verificada a adesão das células indesejadas à placa de cultura e das células germinativas que ficarão no sobrenadante ou fracamente aderidas. O sobrenadante com as células livres será coletado e as células aderidas analisadas e fotografadas. A suspensão (sobrenadante) será colocada em tubo e centrifugada a 100g por 10 minutos a 25 °C e o pellet obtido ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM-F12. A viabilidade das células será novamente avaliada com azul de Tripan como descrito anteriormente.

e) Cultivo primário das células germinativas primárias

Células primárias obtidas pelo plaqueamento diferencial serão dispostas em placas de 12 a 24 poços cobertas com lamínulas pré-tratadas com gelatina bovina 0,1%. As células serão

plaqueadas em concentração igual para cada poço e múltiplas amostras serão feitas para análise em vários tempos, previamente determinados para o cultivo após o início da cultura.

Os meios preparados serão adaptados (DIAS, 2015) com dois tipos de meios, um para induzir a proliferação (LACERDA et al., 2013; PANDA; BARMAN; MOHAPATRA, 2011; SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008) e outro para diferenciação (HONG et al., 2004; SASAKI et al., 2005; DIAS, 2015). As células serão plaqueadas utilizando 1 mL do meio de cultura *Dulbecco Modified Eagle Medium*;/ *Ham F-12 Medium* (DMEM/F12) contendo glicose 18,2 a 22,2%, tamponado com 15 mM de HEPES e bicarbonato de sódio 1,18 g/L (pH7,5), suplementado com AB, Anfotericina e Gentamicina, sendo este o meio basal a ser utilizado em ambos os experimentos.

Para o meio para proliferação celular será suplementado com Glutamina (2 mM), Lactato (0,5 mg/mL), Piruvato de sódio (1 mM), Selênio (2nM) Putrescina (6 mg/mL), Apo transferrina bovina (100g/mL), Insulina regular humana (0,2 “g/mL), Albumina de soro Bovino- BSA (0,5%), Solução de aminoácido não essenciais (1%), 2-mercaptoetanol (100 µM), fator de crescimento de fibroblasto básico recombinante humano- FGFβ (10 ng/mL), fator de crescimento epidermal recombinante humano- EGF (100 ng/mL), *Knockout serum replacement* – formulação livre de soro otimizada para crescer e manter as células-tronco embrionárias não diferenciadas em cultura (1%), SBF (10%), soro de peixe (1%) dos peixes (HONG; SCHARTL, 1996; DIAS, 2015). Durante o cultivo amostras terão seu meio trocado com meio frasco a cada três dias (SHIKINA; IHARA; YOSHIZAKI, 2008; DIAS, 2015) e outra parte durante os tempo de cultivo não realizou nenhuma troca do meio.

O meio para diferenciação será suplementado com Glutamina (2 mM), Piruvato de sódio (1 mM), Selênio (2 nM), solução de aminoácidos não essenciais (1%), 2-mercaptoetanol (100 µM), fator de crescimento de fibroblasto básico recombinante humano- FGFβ (10 ng/mL), SBF (15%), Soro do próprio peixe (1%) (HONG; SCHARTL, 1996; DIAS, 2015;).

Como forma de realizar comparações, concomitantemente a este, serão realizados outros experimentos, acrescentando ao meio de cultura: extrato de hipófise de Carpa, GnRH - Hormônios Liberadores de Gonadotropinas – ou seus análogos; hormônio folículo estimulante- FSH- e hormônio luteinizante – LH- sintéticos em quantidade de 0,1% do peso do peixe vivo, tanto no meio de proliferação como no de diferenciação, com o objetivo é comparar as amostras.

Também, como uma forma de observar a proliferação *in vitro* das espermatogônias e subsequente marcação nos espermatozoides que poderão se formar a partir dessas espermatogônias em cultivo, as células serão incubadas no dia 0 com 0,5 µM de BrdU (5-bromo'-deoxiuridina) (SASAKI et al., 2005 ; DIAS, 2015) nos meios de cultura. Nos dias 3, 5, 8 e 15 amostras com meio trocado a cada 3 dias e sem troca, serão coletadas e fixadas. Já para os meios de diferenciação as

coletas serão após os dias 8 e 15 e posteriormente fixadas. A fixação será realizada com paraformaldeído a 4% por 30 minutos a 4°C e posteriormente processada por imunofluorescência. Todas as culturas serão fotografadas a cada 24 horas, em Microscópio Invertido de Fluorescência do laboratório TRIMA.

f) Método de imunofluorescência das células cultivadas

Para análise de imunofluorescências, as células cultivadas serão assentadas em lâminulas pré-tratadas com gelatina bovina 0,1%. Após o tempo de cultivo determinado, as células serão lavadas com PBS, e fixadas com paraformaldeído 4% + sacarose a 4°C por 30 minutos e lavadas novamente em PBS para retirada do excesso do fixador.

Em seguida as células serão submetidas à recuperação antigênica com solução de Dodecilsulfato de sódio 1% (SDS)/PBS. O bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos será realizado com PBS 0,01 M/soro de cabra 10%, já o bloqueio da autofluorescência com PBS 0,01 M/glicina 1% e a permeabilização da membrana com Triton X-100 0,05%/PBS. Posteriormente, as células serão incubadas com anticorpos primários anti-BrdU (B8434, Mouse anti-human) (1:200) que é um marcador de proliferação celular, anti-OCT4 (ab18976, Rabbit anti-human) (1:100), anti-OCT4 (MAB4419, Mouse anti-human) 1:100) que é marcador de células tronco pluripotentes e germinativas primordiais, anti-GFR α 1 (Ab84106, Rabbit anti-human) (1:160) que é um marcador que pode ser usado para caracterizar e selecionar as células tronco espermatogoniais anti-Vasa (ab13840, Rabbit anti-human) (1:250) que é um marcador de células germinativas.

Após marcação, as células serão incubadas com anticorpos secundários Alexa Fluor 594 (Ab150108, Donkey anti mouse IgG, cor vermelho) (1:500) e Alexa Fluor 488 (A21206, Donkey anti-Rabbit IgG, cor verde) 1: 500) contra os anticorpos primários anti-BrdU e anti-Oct4 (Millipore) e anti-OCT4 (Abcam), anti-GFR α 1 e anti-Vasa, respectivamente, para o controle os anticorpos primários serão omitidos. As lâminas serão aderidas em lâminas histológicas com meio de montagem para fluorescência VectaShield contra corado DAPI. A análise do material e as fotografias serão feitas em Microscópio Invertido de Fluorescência do laboratório TRIMA-UFERSA.

Marcação das células germinativas dos doadores

Para identificação das células germinativas dos doadores em animais receptores após o transplante, é necessário que seja realizada marcação para seu reconhecimento de maneira inequívoca. O marcador PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker – Sigma) será utilizado conforme protocolo (LACERDA, 2006; 2010; LACERDA et al., 2013; 2010).

O PKH26 é um dos marcadores mais utilizados para monitorar a presença de células germinativas transplantadas. Para a marcação a dose padronizada de 16µM será usada (LACERDA, 2006). As células selecionadas para marcação serão novamente lavadas em DMEM/F12 (sem soro ou BSA) por 10 minutos a 400g, e o sobrenadante retirado cuidadosamente de forma que uma quantidade mínima de meio de cultura permanecesse sobre o pellet. Em seguida, as células germinativas selecionadas serão quantificadas (LACERDA, 2010). Para cada dez milhões (10^7) de células será acrescentado 1mL do Diluente C (solução aquosa iso-osmótica livre de Ca^{2+} ou outros sais fisiológicos) para que o pellet seja ressuspensão para sua completa dispersão. Em seguida, será preparado o mesmo volume de solução corante diluindo-se a solução estoque de PKH26 (1mM em etanol) em Diluente C (DIAS, 2015).

A solução corante será adicionada rapidamente à suspensão celular de forma homogênea e sob leve agitação. Esta mistura, assim obtida, deve ser incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Para interromper a reação após 10 minutos será adicionado o mesmo volume de SFB, por 1 minuto. Em seguida, coloca-se a esta suspensão volume igual de DMEM/F12-BSA. As células marcadas com PKH26 devem ser centrifugadas por 10 minutos a 400g, para separá-las da solução acima citada. Este procedimento deve ser repetido por três vezes consecutivas, estando as células aptas a serem transplantadas após estes procedimentos.

A análise da marcação será realizada após o transplante nos períodos de 1 e 10 horas; e de 2 a 9 semanas após o transplante. Para cada espécie transplantada (larvas ou adulto) em número de 5 exemplares serão anestesiados e sacrificados de acordo com a legislação e os procedimentos para cada espécie. As gônadas serão retiradas e posteriormente analisadas através de microscopia de fluorescência para detectar as células do doador (LACERDA, 2010; LACERDA et al., 2013).

1.4. REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, É. R.; FRANÇA, L. R. Effects of diferente temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cell, in sexually mature Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biology of Reproduction, v.80, p. 537-544, 2009. Doi: [10.1095/biolreprod.108.072827](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072827)
- BAR, I., SMITH, A., BUBNER, E., YOSHIZAKI, G., TAKEUCHI, Y., YAZAWA, R., ... & ELIZUR, A. (2016). Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. Reproduction, Fertility and Development, 28(12), 2051-2064.
- BOS-MIKICH, A.; TIMM, M.I.; ZANONA, K.Q. Dos Gametas ao Embrião. Porto Alegre: UFRGS 2008. <http://www.ufrgs.br/gametaembriao/origem.htm>
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive

- development in fishes. Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science, v. 3, p. 52-70, 2011. <https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555724>
- CINALLI, R. M.; RANGAN, P.; LEHMANN, R. Germ cells are forever. Cell, v. 132, n. 4, p. 559-562, 2008. ISSN 0092-8674. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.003>
 - CLARO-GARCIA, A.; ASSEGA, F. M.; NASCIMENTO, R. H. C. TRAMONTINA, N. N.; BIRINDELLI, J. L. Peixe da vez: Utaritchthys sennaebragai Miranda Ribeiro, 1937. Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia, nº 16, p. 47-78, 2015. https://www.researchgate.net/publication/303289263_Peixe_da_vez_Utiaritchthys_sennaebragai_Miranda_Ribeiro_1937
 - CONRTAD, S.; RENNINGER, M.; HENNENLOTTER, J.; WIESNER, T.; JUST, L.; BONIN, M.; AICHER, W.; BÜHRING, H.-J.; MATHEUS, U.; MACK, A.; WAGNER, H.-J.; MATZKIES, M. REPPLE, M.; HESCHELER, J.; SIEVERT, K.-D.; STENZL, A.; SKUTELLA, THOMAS. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. Nature volume 456, pages 344–349 (2008). doi:10.1038/nature07404
 - DIAS, G. C. M. Caracterização, Isolamento e cultura de Espermatogônias Primárias de curimatá. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2015. DOI: 10.11606/T.42.2015.tde-08062015-100249
 - LACERDA, S. M. S. M.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, T. D.; RESENDE, R. R.; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and *in vitro* propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *General and Comparative Endocrinology* 192, p. 95-106, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.013>
 - LACERDA, S. M. S. N. Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental. Dissertação (mestrado em ciências) Universidade federal de Minas Gerais, 2006. <http://hdl.handle.net/1843/ICBC-6W6HT2>
 - LACERDA, S. M. S. N. Transplante singênico e xenogênico de espermatogônias-tronco em tilápias-nilóticas (*Oreochromis niloticus*) adultas. 2010. Tese (doutorado em biologia celular) apresentada a Universidade Federal de Minas, Belo horizonte, MG. <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-8M6J2G>
 - LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; ASSIS, L. H.; RESENDE, F. M.; CAMPOS-SILVA, S. M.; CAMPOS-SILVA, R.; SEGATELLI, T. M.; FRANÇA, L. R. Germ cell transplantation in tilápias (*Oreochromis niloticus*). *Cybium*, v. 32, p. 115-118, 2008. https://www.researchgate.net/publication/287000074_Germ_cell_transplantation_in_tilapia_Oreochromis_niloticus
 - 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*. V. 5, Issue, p. 1-9, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010740>
 - 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*, v. 3, n. 2, p. 146-159, 2006. Disponível em: <

https://www.researchgate.net/publication/228800805_Germ_cells_transplantation_in_fish_The_Nile-tilapia_model. Acesso em: 02/11/2019.

- LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and stereological evaluation of zebrafish *Danio rerio*) spermatogenesis with na emphasis on spermatogonial generations. *Biology of Reproduction*, v. 81, n1 p.177-187, 2009. doi: [10.1095/biolreprod.109.076299](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076299).
- 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. DOI: [10.1371/journal.pone.0012808](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012808)
- OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes. *Physiol Rev* 92: 577–595, 2012. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011>
- 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. DOI: [10.1073/pnas.0509218103](https://doi.org/10.1073/pnas.0509218103)
- PANDA, R. P.; BARMAN, H. K.; MOHAPTRA, C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for *in vitro* propagation. *Theriogenology*, v. 15, p. 241-251, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.031>
- RESENDE, L. B. Avaliação dos efeitos de materiais de sutura em implante cirúrgico de transmissores acústicos em peixes neotropicais de água doce. 2015. Dissertação (mestrado de Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável) Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Branco-MG. <https://ufsj.edu.br/portal-repositorio/File/ppgtds/DISSERTACOES/Lucas.pdf>
- SHIKINA, S.; IHARA, S.; YOSHIZAKI, G. Culture Conditions for Maintaining the Survival and Mitotic Activity of Rainbow Trout Transplantable Type A Spermatogonia. *Molecular Reproduction And Development*, v. 75, p. 529-537, 2008. <https://doi.org/10.1002/mrd.20771>
- SHIKINA, S; YOSHIZAKI, G. Improved *In Vitro* Culture Conditions to Enhace the Survival, Mitotic Activity, and Transplantability of rainbow Trout Type A Spermatogonia. *Biology of Reproduction*, V. 83, p. 268-276, 2010. doi: [10.1095/biolreprod.109.082123](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082123)
- THOMA, E. C.; WAGNER, T. U.; WEBER, I. P.; HERPIN, A.; FISCHER, A.; SCHARTL, M. Ectopic Expression of Single Transcription Factors Directs Differentiation Of A Medaka Spermatogonial Cell Line. *Stem Cells Dev.* 2011 Aug;20(8):1425-38. doi: [10.1089/scd.2010.0290](https://doi.org/10.1089/scd.2010.0290)
- WEISSE, C; WEBER, S.; MATZKIN, Z.; KLIDE, A. Surgical removal of a seminoma from a black sea bass. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, July 15, 2002, Vol. 221, No. 2, Pages 280-283. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.280>
- YOSHINAGA, T.T. Efeitos de imunossupressores sobre o sistema imunológico em transplantes de células germinativas em trutas arco-íris. Dissertação (Mestrado em Ciência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018. DOI: [10.11606/D.10.2019.tde-17102018-082442](https://doi.org/10.11606/D.10.2019.tde-17102018-082442)
- YOSHIZAKI G, LEE S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. *Stem Cell Research* 29, p. 103-110, 2018. Doi: [10.1016/j.scr.2018.03.015](https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.015)

- YOSHIZAKI, G.; OKUTSU, T.; MORITA, T.; TERASAWA, M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y. Biological Characteristics of Fish Germ Cells and their Application to Developmental Biotechnology. *Reprod Dom Anim*, 47 (Suppl, 4), 187-192, 2012. doi: [10.1111/j.1439-0531.2012.02074.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02074.x)
- YOSHIZAKI, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*. 137, p. 1227–1230, 2010. Doi:[10.1242/dev.044982](https://doi.org/10.1242/dev.044982)
- YOSHIZAKI, G.; OKUTSU, T.; MORITA, T.; TERASAWA, M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y. Biological characteristics of fish germ cells and their application to developmental biotechnology. *Reprod. Domest. Anim.* 2012, n° 47, 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02074.x>

3. CRIOPRESERVAÇÃO DE GÔNADAS E CÉLULAS GERMINATIVAS (OOGÔNIAS E ESPERMATOGÔNIAS)

3.1. Introdução

A criopreservação de células germinativas tem recebido especial atenção nos últimos anos. A criopreservação de sêmen de peixes, embora seja uma técnica simples (BOBE E LABBE 2010), apresenta a desvantagem de não armazenar e fornecer as informações da mãe (LINHARTOVÁ et al., 2014). Oócitos e embriões de peixes apresentaram tamanho grande e alto teor de vitelo (YOSHIZAKI; LEE, 2018), demonstram dificuldade na penetração do crioprotetor e alta sensibilidade ao congelamento (ROBLES et al., al. 2009), por isso células germinativas vem sendo testadas e apontadas como alternativa (OKUTSU et al. 2006; LINHARTOVÁ et al., 2014; YOSHIZAKI; LEE, 2018).

Atualmente já existem protocolos de criopreservação bem-sucedidos de células germinativas em várias espécies de peixes teleósteos (PŠENIČKA et al., 2016). Quando criopreservadas podem ser usadas para regenerar populações de peixes (FRANÉK et al., 2019). Células congeladas e armazenadas corretamente demonstram viabilidade por anos com a manutenção da integridade do DNA (MAZUR, 1977), podendo se tornar uma ferramenta importante para espécies em extinção e no desenvolvimento da aquicultura de uma forma geral.

As células-tronco espermatogoniais, células-tronco oogoniais e células germinativas primordiais apresentam plasticidade sexual, podendo restaurar exemplares independente do sexo di receptor (OKUTSU et al., 2015). Após a criopreservação e transplante, estas células podem incorporar as gônadas dos receptores, promover gametogêneses sem comprometimento dos gametas e descendentes quando transplantadas (FRANÉK et al., 2019).

Para o sucesso da criopreservação, as células alvo devem ser separadas de outras células testiculares ou ovarianas já maduras, ou seja, é necessária a sua purificação (LINHARTOVÁ et al., 2014) com o gradiente de Percoll descontínuo (LACERDA et al., 2006; 2010; 2013) (figura 4). A criopreservação de ovários e testículos inteiros também já vem sendo realizada e demonstraram que ovários podem permanecer congelados por pelo menos 1185 dias sem prejudicar a viabilidade de oogônias para o transplante (YOSHIZAKI; LEE, 2018), (figura 5).

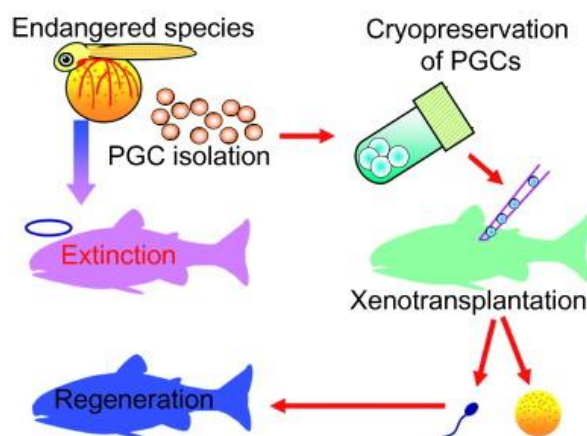


Figura 4: Esquema de separação de células-tronco da linhagem germinativa, criopreservação e posterior transplante para regeneração de peixes ameaçados de extinção (YOSHIZAKI; LEE, 2018).

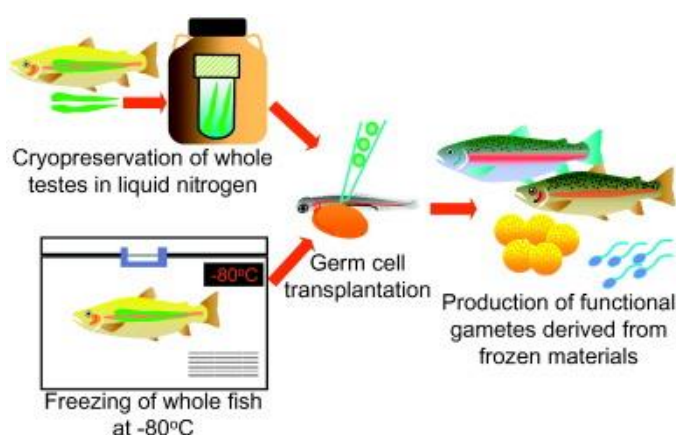


Figura 5: Esquema de congelamento de gônadas, criopreservação e posterior transplante para regeneração de peixes ameaçados de extinção (YOSHIZAKI; LEE, 2018).

Transplantes realizados com células germinativas de carpas machos criopreservadas demonstraram que a viabilidade pós-descongelamento de espermatogônias melhorou em 40% (Franěk et al., 2019). Este aumento está relacionado à otimização de fatores como: criopreservadores, suas concentrações, taxa de resfriamento, tamanho do tecido, tempo de incubação e a suplementação. Outros estudos com salmonídeos demonstraram que espermatogônias criopreservadas por 5 (cinco) anos apresentam alta capacidade de gerar gametas funcionais após transplante (LEE; IWASAKI; YOSHIZAKI, 2016). No entanto, a eficácia do crioprotetor e o tempo de preservação são específicos para cada espécie (LINHARTOVÁ et al., 2014).

A Criopreservação e o banco de germoplasma de peixes são considerados ferramentas para reprodução artificial e melhoramento genético de espécies da aquicultura (LINHARTOVÁ et al., 2014). A técnica de criopreservação aplicada a peixes traz benefícios, como: sincronizar a disponibilidade gametas, armazenamento prolongado de células sem envelhecimento, transporte

conveniente de material genético, reduz o número de ninhadas necessárias em incubatórios e bancos de genes vivos (ALAVI et al. 2012; LINHARTOVÁ et al., 2014).

3.2. Objetivos

Geral

- Elaborar protocolo de criopreservação de células-tronco da linhagem germinativa de peixes para uso na aquicultura e recuperação de estoque natural.

Específicos

- Desenvolver protocolo para criopreservação de gônadas, células germinativas, espermatogônias e oogônias de peixes doadores;
- Avaliar a viabilidade de gônadas, células germinativas, espermatogônias e oogônias após processo de criopreservação;

3.3. Material e métodos

3.3.1. Criopreservação

Para construção de protocolo de criopreservação serão utilizadas células isoladas e gônadas inteiras, neste último caso desde que menores que 12 centímetros de tamanho.

Para preparação das amostras, todos os peixes serão anestesiados (dose letal) e sacrificados conforme descrito acima até constatada a morte. Logo a após, os exemplares serão aspergidos em álcool 70% por 1 minuto e posteriormente lavados com água desinfetada e clorada (LACERDA, 2010); (DIAS, 2015). Posteriormente, serão medidos com paquímetro e pesados com balança de precisão e colocados em decúbito dorsal na mesa de cirurgia de peixes (Foto1).

Para realizar estudos com a retirada das gônadas, os peixes passarão por procedimento cirúrgico e terão dados registrados individualmente como: sexo, papila urogenital ou cloaca, e tamanho do comprimento padrão (distância em linha reta da ponta do focinho até a base da barbatana caudal, em mm). Após a obtenção destes dados, será realizada uma incisão com tesoura micro dissecante para expor a cavidade abdominal (HAGEDORN et al., 2018).

a) Criopreservação de células-tronco de peixes

Após o procedimento descrito acima, as gônadas (testículos ou ovários) e outras estruturas reprodutivas serão removidas e colocadas em meio de Eagle refrigerado (0°C) com soro bovino fetal (FBS) a 5% e 2 mM de L-glutamina. Transcorrida a cirurgia, pequenas amostras (cerca de 2 mm × 2 mm) da musculatura miomérica da parede abdominal ou da barbatana peitoral ou dos órgãos acessórios serão removidas de amostras selecionadas, imersas em etanol a 95% e

armazenadas a 22–23°C (HAGEDORN et al., 2018). O estado reprodutivo será determinado através da histologia (itens 1.3.2 e 1.3.3 do projeto 2 acima descrito).

As gônadas retiradas serão mantidas resfriadas a 4°C com 1 ml de PBS e BSA a 0,2% em um frasco de microcentrífuga Eppendorf e posteriormente, cada lóbulo testicular/ovariano individualmente transferido para um homogeneizador de vidro e macerados (~ 20 vezes) até que todos os aglomerados celulares sejam desagregados. A limpeza do homogeneizador será com uso de água e etanol a 70% e seco a cada procedimento

A concentração celular de cada amostra será determinada com um hemocítômetro diluído para $\sim 5 \times 10^6$ células / ml com PBS resfriado e BSA a 0,2%. A viabilidade será determinada antes da criopreservação. As amostras serão coradas para avaliar a viabilidade com azul de Tripán. Posteriormente, alíquotas de 500 µL das células dissociadas diluídas serão colocadas em frascos criogênicos de 2 ml com 500 µl de uma solução crioprotetora a 20% (dimetilsulfóxido, DMSO, composta por vol / vol com PBS), mantida de 22 a 23 ° C por 10 min para ajudar a equilibrar o crioprotetor nas células testiculares em até 10 criotubos por peixe amostrado.

‘Os criotubos serão congelados em dois freezers passivos, um com álcool ao redor dos criotubos (Mr. Frosty™, Fisher Scientific) o outro, uma liga termocondutora e materiais isolantes ao redor dos frascos criogênicos (CoolCell®, BioCision). Ambos os freezers passivos com frascos criogênicos serão colocados em um freezer a -80°C, que resfriará os frascos frios a uma taxa de 0,5 a 1,0°C / min até atingir -80°C. Quando atingirem essa temperatura, entre 4 a 8 h, os frascos criogênicos serão removidos do freezer e imersos em nitrogênio líquido a -196°C por 2 min e realizada a avaliação.

b) Criopreservação de gônadas inteiras de peixes

Para o experimento serão necessários 6 exemplares de cada espécie por sexo para as dissecções. Os testículos e ovários serão retirados e mantidos individualmente em tubos Eppendorf contendo meio de Eagle suplementado com FBS a 5%, HEPES 25 mM e L-glutamina 2 mM, em gelo. Duas soluções crioprotetoras serão (HAGEDORN et al., 2018) usadas para testículos:

- Solução1: dimetilsulfóxido 1,3 M, trealose 0,1 M, BSA a 1,5% em 35,2% do meio Base (HEPES 55,27 mM, NaCl 375,48 mM, KCl 7,28 mM, KCl $2 \times 23,1$ mM, KH 2 PO 4 23,8 mM, Na 2 HPO 4 , piruvato de sódio 3,64, CaCl 2×2 H 2 O 2,6 mM, MgCl 2×6 H 2 1,4 mM), pH 7,8 em água deionizada;
- Solução 2: dimetilsulfóxido 1,3 M, trealose 0,1 M no meio de Eagles com 5% de FBS, HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, ele é um criodiluyente relativamente simples equivalente a solução 1.

Após as dissecações, testículos emparelhados de cada peixe serão armazenados separadamente em tubo criogênico, um contendo cada tratamento (solução 1 e solução 2). As amostras serão equilibradas no gelo por 60 minutos e depois resfriadas a -80°C em um CoolCell®, após atingir -80°C (~ 4 a 8 h), os frascos criogênicos foram removidos do freezer e imersos em nitrogênio líquido no qual atingiram -196°C por 2 min. (figura 6)

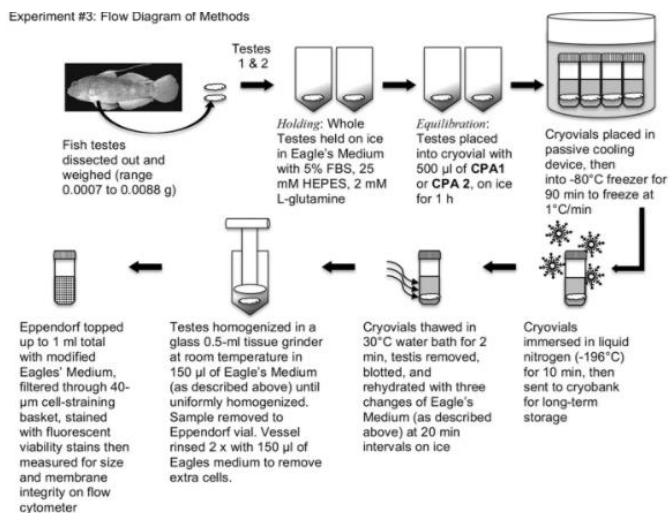


Figura 6. Resumo de processo de criopreservação de gônadas (HAGEDORN et al., 2018).

Em fêmeas, os ovários preferencialmente de exemplares imaturos, serão utilizados em metodologia já consolidada (LEE; KATAYAMA; YOSHIZAKI, 2016). Os ovários dissecados serão transferidos para criotubos de 1,2 mL (TPP, Suíça) contendo 500 µL de meio de criopreservação (pH 7,8) com agente crioprotetor permeável (CPA; propilenoglicol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido ou glicerol a 1,0, 1,3 ou 1,6 M), sem acumulação de calor CPA (D-glicose 0,1 M ou di-hidrato de D - [+] - trealose 0,1 M e BSA a 1,5% [p / vol], BSA a 1,5% [vol / vol], 10% [vol / vol] de gema de ovo fresca, ou 1,5% [w / vol] de leite em pó desnatado) e 35,2% (vol / vol) de diluidor. Para 100% do extensor devemos misturar: Hepes 55,27 mM, 375,48 mM de NaCl, 7,28 mM de KCl, 23,10 mM de KH_2PO_4 (Wako), 3,82 mM de Na_2HPO_4 (Wako), piruvato de sódio 3,64 mM (Sigma-Aldrich), 2,6 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Wako) e 1,4 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Wako), pH 7,8; $n = 3-14$) (LEE; IWASAKI; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2013)

Os criotubos serão mantidos em gelo por 60 min e resfriados a $-1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ por 90 min usando um plástico Bicell recipiente de congelação localizado em um congelador a -80°C antes da imersão em nitrogênio líquido. Após a criopreservação em nitrogênio, os criotubos serão rapidamente descongelados a 10°C em banho-maria e reidratado (LEE; IWASAKI; SHIKINA; YOSHIZAKI, 2013).

3.3.2. Descongelamento, avaliação da criopreservação e transplante

O descongelamento será realizado em banho-maria a 30°C, ato contínuo, cada lóbulo testicular/ ovariano será transferido para outro tubo para retirada da solução crioprotetora e realizada a troca do meio Eagle suplementado por três vezes (20 minutos cada) para reidratação. Posteriormente, os lóbulos dos testículos serão secos, transferidos individualmente para um moedor de tecidos de vidro de 0,5 mL com 150 µL de meio suplementado de Eagle e homogeneizados.

Realizada a mistura, o homogeneizado será removido para um tubo Eppendorf e a lavagem do o triturador de tecidos para coletar as células restantes, deve-se lavar com duas alterações em 150 µL do meio de Eagle suplementado. A amostra deverá ser completada com aproximadamente 1 mL no tubo Eppendorf e depois filtrada através de um filtro de células de 40 µm para remover quaisquer pedaços restantes de tecido.

Para uso posterior após cada homogeneização, o moedor de tecidos será preenchido com solução de lixívia a 10%, para erradicar qualquer material genético restante, mantido em repouso (10 minutos), lavado com água deionizada e seco antes do processamento do próximo testículo.

As amostras então passarão pelos procedimentos descritos no Projeto 2: digestão enzimática dos testículos e ovários; separação por gradiente de Percoll; avaliação da metodologia de separação por gradiente de Percoll; plaqueamento diferencial por adesão das células germinativas após centrifugação com Percoll; cultivo primário das células germinativas primárias; método de imunofluorescência das células cultivadas; e posterior transplante em alevinos e adultos triplóides (descrito no Projeto nº 4 a seguir).

3.4. Referências

- ALAVI S.M.H.; HATEF A.; PSENICKA M.; KASPAR V.; BORYSHPOLETS S.; DZYUBA B.; COSSON, J.; BONDARENKO V.; RODINA M.; GELA D.; LINHART O. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22, (2012)p. 861–886. DOI: [10.1007/s11160-012-9270-x](https://doi.org/10.1007/s11160-012-9270-x)
- DIAS, G. C.M. Caracterização, Isolamento e Cultura de Espermatogônias Primárias de curimatá. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2015. DOI: [10.11606/T.42.2015.tde-08062015-100249](https://doi.org/10.11606/T.42.2015.tde-08062015-100249)
- FRANĚK, R.; MARINOVIĆ, Z.; JLUJIĆ, J.; URBÁNYI, B.; FUČÍKOVA, M.; KASPAR, V.; PSENICKA, M.; HORVÁTH, A. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia*. Plos Oline 14(4): e0205481. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205481>
- HAGEDORN, M. M.; DALY, J.P.; CARTER, V.L.; COLE, K.S.; JAFAR, Z.; LAGER, C.V.; PARENTI, L. R. Cryopreservation of Fish Spermatogonial Cells: The Future of Natural History Collections. *Sci Rep* 8, 6149 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24269-3>

- LACERDA S.M.S.N.; BATLOUNI S.R.; SILVA S.B.G.; HOMEM C.S.P.; FRANCA L.R. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Animal Reproduction Science*, v. 3, nº 2, p.146–159., april/June. 2006. https://www.researchgate.net/publication/228800805_Germ_cells_transplantation_in_fish_The_Nile-tilapia_model
- LACERDA, S. M. S. M.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, T. D.; RESENDE, R. R; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and *in vitro* propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *General and Comparative Endocrinology* 192, p. 95-106, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.013>
- LACERDA, S. M. S. N. Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental. Dissertação (mestrado em ciências) Universidade federal de Minas Gerais, 2006. <http://hdl.handle.net/1843/ICBC-6W6HT2>
- LACERDA, S. M. S. N. Transplante singênico e xenogênico de espermatogônias-tronco em tilápias-nilóticas (*Oreochromis niloticus*) adultas. 2010. Tese (doutorado em biologia celular) apresentada a Universidade Federal de Minas, Belo horizonte, MG. <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-8M6J2G>
- LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; ASSIS, L.H; RESENDE, F. M.; CAMPOS-SILVA, S. M.; CAMPOS-SILVA, R.; SEGATELLIM T. M.; FRANÇA L. R. Germ cell trasnplantation in tilápias (*Oreochromis niloticus*). *Cybum*, v.32, p. 115-118, 2008. https://www.researchgate.net/publication/287000074_Germ_cell_transplantation_in_tilapia_Oreochromis_niloticus
- 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*. V. 5, Issue, p. 1-9, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010740>
- 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*, v. 3, nº2, p. 146-159, 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228800805_Germ_cells_transplantation_in_fish_The_Nile-tilapia_model. Acesso em: 02/11/2019.
- LEE, S.; IWASAKI, Y; SHIKINA, S; YOSHIZAKI, G. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013 Jan 29; 110(5): p. 1640–1645. doi: [10.1073/pnas.1218468110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218468110)
- LEE, S.; IWASAKI, Y; YOSHIZAKI, G. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. *Cryobiology*, xxx, 2016, p. 1-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.08.001>
- LEE, S.; KATAYAMA, N.; YOSHIZAKI, G. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, S0006-291X (2016)31420-6. DOI: [10.1016/j.bbrc.2016.08.156](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.156) ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27581197>
- LINHARTOVÁ, Z.; RODINA, M.; GURALP, H.; GAZO, I.; SAITO, T.; PŠENIČKA M. Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). *Czech J. Anim. Sci.*, 59, 2014 (8): 381–390. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143317428>
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, v.14, Issue 3, June 1977, Pages 251-272. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90175-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90175-4)
- OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; SAKAMOTO, T.; MOCHIZUKI, M.; YOSHIZAKI, G. Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into

- female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 2015; 446: 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.020>
- 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*, 2006, 52, 685–693. DOI: [10.1262/jrd.18096](https://doi.org/10.1262/jrd.18096)
 - PŠENIČKA, M.; SAITO, T.; RODINA, M.; DZYUBA, B. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells. *Cryobiology*, v. 72, Issue 2, april 2016, pages 119-122. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.005>
 - ROBLES V.; CABRITA E.; HERRAEZ, M. P. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. *Zebrafish*, v.6, n° 3, p. 281–293. Sep. 2009. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0592>
 - YOSHIZAKI, G.; LEE, S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. *Stem cell Research* 29, 2018, p. 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.015>
 - YOSHIZAKI, G; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*. 2010; 137: 1227–30. <https://doi.org/10.1242/dev.044982> PMID: 20223765 ; DOI:[10.1242/dev.044982](https://doi.org/10.1242/dev.044982)

4. XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE PEIXES E CRUSTÁCEOS EM PEIXES

4.1. INTRODUÇÃO

O número de espécies de peixes usadas na aquicultura é amplo, sendo algumas bastante apreciadas e de elevada importância econômica. Entretanto, uma pequena parte apresenta reprodução tardia, baixa fecundidade e/ou não consegue se reproduzir naturalmente em cativeiro, necessitando de intervenção humana. Além disto, a produção de peixes nativos enfrenta barreiras reprodutivas e de legislação, que afetam a oferta de alevinos no mercado. Este cenário possibilitou o emprego de novas técnicas como o transplante de células tronco germinativas, que vêm sendo utilizadas nas duas últimas décadas em mamíferos. Essa técnica biológica de reprodução, já estabelecida, apresenta alto potencial biotecnológico e demonstra a mesma aplicabilidade para reprodução de peixes.

O xenotransplante de células tronco germinativas foi descrito inicialmente no início do milênio (TAKEUCHI et al., 2004; OKUTSU et al., 2007) e vem sendo empregado com sucesso em larvas recém eclodidas. Esta técnica permitiu gerar gametas do salmão mansu (*Oncorhynchus masou*) em Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), evitando a rejeição das células germinativas introduzidas (YOSHIZAKI e Lee, 2018). Além disso, apresenta um importante aspecto, pois demonstrou que as células-tronco da linhagem reprodutiva do doador produzissem gametas com base no sexo do receptor, não no próprio gênero do doador (YOSHIZAKI et al., 2010). Outros estudos realizaram o transplante de células germinativas primordiais migratórias para o blastodisco no estágio da blástula, antes da sua diferenciação em células germinativas (SAITO et al., 2010), transplantaram células-tronco espermatogoniais em adultos com espermatogênese e oogênese endógena estabelecidas, após o qual foram suprimidas por droga com ação imunossupressora (MAJHI et al., 2009; LACERDA et al., 2010, 2013). Peixes triplóides também foram recentemente desenvolvidos para esta finalidade (YOSHIZAKI e Lee, 2018).

Quando usado em larvas, o transplante é realizado por via intraperitoneal próximo à crista genital com uso de pipeta de vidro, que possibilita que células alogênicas ou xenogênicas de um peixe doador sejam transferidas para um peixe receptor (Figura 6). Após o transplante, estas células migram espontaneamente para o testículo ou ovários imaturos, onde são incorporadas e dão início ao processo de espermatogênese ou oogênese, respectivamente (TAKEUCHI et al., 2003; OKUTSU et al., 2006). Em adultos pode ser realizada via papila urogenital (LACERDA et al., 2010) em peixes grandes porte por *rete testis* (guiado por ultrassonografia) ou através da rede extratesticular, localizada entre a rede intratesticular e os ductos eferentes (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2006).

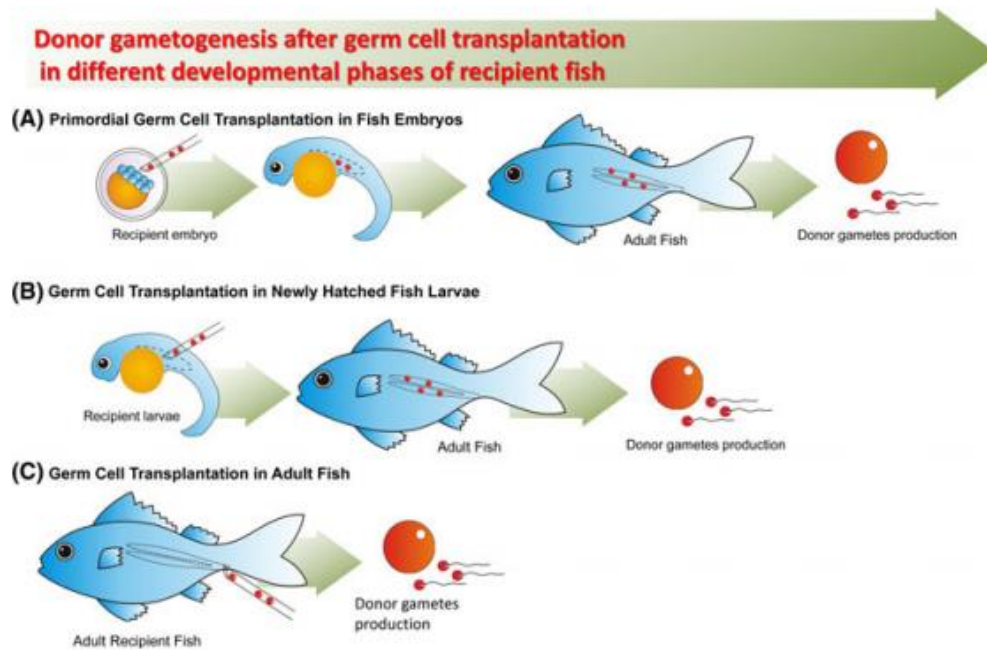


Figura 6. Ilustração das diferentes fases do desenvolvimento de peixes receptores. A- Transplante de células germinativas primordiais em embriões; B- Transplante na cavidade peritoneal de larvas; C- transplante em adultos com gônadas suprimidas. (LACERDA et al., 2012).

Antes do transplante as gônadas do doador passam por uma digestão enzimática para obtenção da suspensão celular, que posteriormente é separada por gradiente de Percoll e em seguida, submetida a um plaqueamento diferencial para obtenção do pool de espermatogônias ou oogônias (LACERDA et al., 2006, 2013). Também para uma melhor purificação, após digestão enzimática, pode-se realizar a citometria de fluxo para purificação das células (KISE et al., 2012). Independente dos métodos, gradiente de Percoll ou citometria de fluxo, as células podem ser cultivadas e, independente do meio de cultura, a capacidade de proliferação continua (HONG et al., 2004).

O transplante de células germinativas é um procedimento delicado que utiliza um estereomicroscópio e um micromanipulador (YOSHIZAKI e LEE, 2018). Apresenta-se como uma nova e promissora técnica de reprodução que pode ser empregada em espécies destinadas à aquariofilia, uma inovação com valor inestimável para a perpetuação de espécies, principalmente as em perigo de extinção, além do papel significativo no desenvolvimento dos cenários aquícola ornamental nacional e internacional.

4.2. OBJETIVOS

Geral

- Produzir protocolos para produção de peixes de difícil reprodução (doadores), pelo xenotransplante de células tronco germinativas para larvas e adultos de peixes triploídes substitutos.

Específicos

- Verificar viabilidade das pós-larvas e adultos de peixes substitutos como modelo receptor para os transplantes singênico e xenogênico de espermatogônias e oogônias de espécies de peixes doadores com importância ecológica e econômica;
- Analisar as gônadas dos animais substitutos transplantados por microscopia de fluorescência, para verificação da presença de células germinativas doadoras;
- Avaliar a funcionalidade dos gametas produzidos pelos peixes substitutos, pelo cruzamento após atingirem idade de maturação sexual ou por indução;
- Avaliar as ninhadas produzidas por peixes transplantados, através da caracterização molecular da progênie por meio de DNA microssatélite.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Animais envolvidos

Os alevinos e/ou adultos destinados a serem barrigas substitutas (receptores) serão provenientes das espécies de peixes listadas no projeto Produção de triploídes (Projeto 1). Para tanto, será obedecida uma relação de 1000 larvas por espécie receptora/ espécie doadora conforme a tabela abaixo. A escolha do receptor (barriga substituta) será com base nas características do peixe doador, preferencialmente que seja filogeneticamente mais próximo para aumentar as chances de sucesso do transplante. As células dos doadores para os transplantes serão provenientes dos trabalhos realizados no projeto 2 e serão distribuídas conforme a relação doadores/ receptores abaixo (quadro 3).

Espécie Receptora	Espécie(s) Doadora(s)	Nº de larvas a serem transplantadas por espécies	Nº de espécies doadoras	Larvas transplantadas (Total)
<i>Astyanax bimaculatus</i>	<i>Leporinus octomaculatus</i>	1000	1	1000
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Utiaritchthys sennaebregai</i> ; <i>Myleus micans</i> ; <i>Serrasalmus geryi</i>	1000	3	3000
<i>Leporinus friderici</i>	<i>Leporinus octomaculatus</i>	1000	1	1000
<i>Leporinus obtusidens</i>	<i>Leporinus octomaculatus</i>	1000	1	1000

<i>Oreochromis</i> spp.	<i>Oreochromis</i> spp; <i>Osteoglossum bicirrhosum</i> ; <i>Arapaima gigas</i> ; <i>Astronotus ocellatus</i> ; <i>Panulirus argus</i>	1000	5	5000
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	<i>Conorhynchus conirostris</i> ; <i>Aguarunichthys tocantinsensis</i> ; <i>Kalyptodoras bahiensis</i>	1000	3	3000
<i>Piaractus brachipomus</i>	<i>Utiaritichthys sennaebagai</i> ; <i>Myleus micans</i> ; <i>Serrasalmus geryi</i>	1000	3	3000
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Utiaritichthys sennaebagai</i> ; <i>Myleus micans</i> ; <i>Serrasalmus geryi</i>	1000	3	3000
<i>Pimelodus maculatus</i>	<i>Conorhynchus conirostris</i> ; <i>Aguarunichthys tocantinsensis</i> ; <i>Kalyptodoras bahiensis</i>	1000	3	3000

4.3.2. Transplante células germinativas

4.3.2.1. Larvas de peixe

Para cada espécie doadora, serão utilizadas larvas dos peixes receptores (n=1000) que serão anestesiadas e contidas em placas moldadas com ágar 2,5% para realização da microinjeção. Para determinar a melhor idade para o transplante, a operação será realizada em vários dias pós-fertilização (4, 6, 8, 10, 14) a depender da espécie. A quantidade de células microinjetadas (3, 6 e 10 mil/cel) será identificada e qual melhor porcentagem de peixes com as gônadas colonizadas de células do doador, para cada idade e espécie (SEKI et al., 2017).

O transplante será realizado no laboratório TRIMA/UFERSA em condições estéreis. Assim, será procedido com o auxílio de estereomicroscópio, seringa com filtro de ar, agulha 34 g, e pipeta de vidro específica para o transplante. Após os transplantes, os peixes serão colocados em aquário com água corrente para recuperação da anestesia e observados por 10 dias (AP).

4.3.2.2. Em peixes adultos

Os peixes adultos a serem utilizados serão da mesma espécie descrita no projeto 1 (quadro 1) eles serão triploídes ou não. No caso de não triploídes, será realizada a depleção da espermatogênese e oogênese endógena com a droga quimioterápica Busulfan (LACERDA et al.,

2010; MAJHI et al., 2014; SIQUEIRA-SILVA et al., 2018). A precisão da via de transplante requer conhecimento prévio da anatomia do trato genital dos peixes.

a) Avaliação da via de transplante

Para o prévio conhecimento da anatomia do trato genital, 5 exemplares de cada espécie que ainda não tenham protocolos descrito serão analisados anteriormente para determinar a melhor forma de realizar o transplante, de acordo com as especificidades de cada anatomia. Posteriormente, será realizada a pigmentação da via de transplante com azul de Tripán 0,4% com auxílio de microcânula acoplada a uma seringa de 3 mL e um microscópio estereoscópio. Em seguida os peixes serão sacrificados e terão sua cavidade celomática aberta para confirmação da presença do corante e para confirmação da distribuição da droga supressora em toda gônada sem prejudicar outras áreas (LACERDA et al., 2010).

b) Depleção da espermatogênese e oogênese dos animais receptores quando não triplóides

Animais sexualmente maduros (n= 30) serão mantidos a uma temperatura de 35°C por uma semana antes do tratamento com Busulfan. Peixes serão tratados com duas injeções de Busulfan previamente diluídas em dimetil sulfoxido e, posteriormente, em água destilada sob agitação constante $\pm$ 37°C. A primeira dose será com 18 mg/kg/peso corporal e a segunda 15 mg/kg/peso corporal, injetados por via de transplante, com intervalo de duas semanas entre as mesmas. Como forma de controle, 10 peixes receberão as injeções apenas com diluente (DMSA e água destilada) para realizar comparações.

Quatro exemplares tratados e dois do controle serão sacrificados e terão suas gônadas coletadas após 3 semanas da 1 dose, sendo sacrificadas para análise histológica e avaliação do efeito supressor da droga utilizada. Nos exemplares tratados com a segunda dose após o mesmo período anterior também serão analisados em mesma quantidade.

c) Transplante de células germinativas

Após confirmação da melhor via de transplante e sucesso da supressão, o transplante vai acontecer pela papila urogenital dos peixes com espermatogênese/oogênese deprimida ou peixes 3n, com auxílio de microscópio estereoscópio, utilizando-se uma microcânula de poliestireno com aproximadamente 300µm de diâmetro externo em sua extremidade, acoplada à seringa de 3mL.

Cada animal irá receber uma quantidade de células, que depende de cada espécie. A solução contendo as células para o transplante será enriquecida com dMEM e do corante vital azul de Tripán 0,4% em salina (Sigma), na proporção de 1:1 (LACERDA et al., 2010).

4.3.2.3 Análise das gônadas dos receptores para verificar a presença de células marcadas

Larvas e adultos receberão células germinativas dos doadores marcadas com PKH26 (LACERDA et al., 2010; 2013). Após transplantes, os exemplares serão acomodados em caixas de 1.000 litros com circulação de água, aeração e controle da temperatura com termostato. A análise dos peixes (5) será realizada 1 mês após o transplante e das larvas (15) ou quando atingirem 15g, no momento em que suas gônadas serão coletadas e para posterior análise em microscopia de luz (LACERDA et al., 2010).

Após coleta, fragmentos dos testículos/ovários desses animais serão embebidos em meio apropriado (Jung Tissue Freezing Medium; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha), congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados $\pm$ -80°C. Estes fragmentos serão seccionados na espessura de 5 μ m, utilizando-se criostato $\pm$ -30°C (LEICA CM 1850; Leica Instruments, Nussloch, Alemanha). Os cortes obtidos serão secos em geladeira e as lâminas montadas com éster de cianoacrilato (Super BonderÆ). Para a análise histológica será utilizado o microscópio (Olympus IX-70) de fluorescência com filtro U-MWG da Olympus. Todas as fotos serão feitas utilizando câmera digital e guardadas para análises. Outros fragmentos serão fixados em glutaraldeído tamponado a 4%, incluídos em glicol metacrilato e preparados rotineiramente para avaliação da presença eventual de células germinativas oriundas do doador.

4.3.3.4 Viabilidade do transplante

a) Larvas

Para avaliação da viabilidade do transplante, larvas transplantadas serão cultivadas até atingirem a idade reprodutiva, e induzidas conforme os protocolos de indução citados no projeto 1 (quadro 2). O objetivo é avaliar a viabilidade dos gametas. Estes alevinos (F1) provenientes de reprodutores transplantados, também serão cultivados e posteriormente avaliados quanto a funcionalidade dos seus gametas. Como forma de se certificar que os animais F1 são realmente provenientes de células doadores, serão submetidos à análise de DNA microssatélite em laboratório parceiro, sendo cinco fêmeas e cinco machos conforme a metodologia descrita por (LACERDA et al., 2010).

b) Adultos

Confirmado o sucesso dos transplantes, os peixes serão cultivados e separados para reprodução quando atingirem a maturação sexual. O objetivo também é avaliar a funcionalidade dos gametas gerados por células transplantadas e o sucesso relativo dos transplantes de peixes transplantados pelo número de peixes que desenvolveram as células transplantadas). Para reprodução os peixes serão induzidos conforme os protocolos estabelecidos no projeto 1(quadro 2).

Quadro 2: Espécies, hormônio para indução e dose a serem utilizadas para produção de triploídes

Espécie	Hormônio	Dose	Referência
<i>Astyanax bimaculatus</i>	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC)	5 mg/kg (fêmeas 20% e 80%, 14 horas depois da primeira) e 3mg/ kg (machos dose única) no momento da segunda dose das fêmeas	(MARCON et al., 2019; ORBOLATO et al., 2006)
<i>Colossoma macropomum</i>	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC)	5,5 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 12 horas da primeira) e 2,5 mg/kg (machos dose única) no momento da segunda dose das fêmeas.	(EMBRAPA, 2012)
<i>Leporinus friderici</i>	EBHC	1,5 mg/kg (fêmeas 33,% e 67%, após 6 horas da primeira) e 1 mg/kg (machos dose única) no momento da segunda dose das fêmeas.	(SOUZA, 2015 SAMPAIO; SATO, 2009)
<i>Leporinus obtusidens</i>	EBHC	5 mg/kg (fêmeas 10% e 90%, 12 horas depois da primeira) e 3mg/ kg (machos dose única) no momento da segunda dose das fêmeas	(QUEROL et al., 2013)
<i>Oreochromis spp.</i>	Gonadotrofina coriônica humana (hCG)	5000 UI/kg (fêmeas 10,% e 90%, após 18 horas da primeira)	(HASSUN et al., 2018)
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Ovaprim (20 um de GnRH α e 10 mg de domperidona)	0,3 e 0,6 ml/ kg nas fêmeas e 0,4 ml/kg machos .	(LEGENDRE et al., 2000)
<i>Piaractus brachypomus</i>	EBHC	5,5 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 12 horas da primeira) e 2 mg/kg (machos dose única 0,5 ml/kg) no momento da segunda dose das fêmeas.	(LIMA, 2014)

<i>Piaractus mesopotamicus</i>	EBHC	6 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 10 horas da primeira) e 3 mg/kg (machos dose única 0,5 ml/kg) no momento da segunda dose das fêmeas.	(GUERREIRO et al., 2011)
<i>Pimelodus maculatus</i>	EBHC	5,5 mg/kg (fêmeas 1º 10% e 90%, após 6 horas da primeira) e 5 mg/kg (machos dose única 0,5 ml/kg) no momento da segunda dose das fêmeas.	(BERTOLINI, 2018)

5. REFERÊNCIAS

- HONG, Y.; LIU, T.; ZHAO, H.; XU, H.; WANG, W.; LIU, R.; CHEN, T.; DENG, J.; GUI, J. Establishment of a normal medaka fish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, p. 8011–8016, 2004. [Doi: 10.1073/pnas.0308668101](https://doi.org/10.1073/pnas.0308668101)
- KISE, K.; YOSHIKAWA, H.; SATO, M.; TASHIRO, M.; YAZAWA, R.; NAGASAKA, Y.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Flow-cytometric isolation and enrichment of teleost type-A spermatogonia based on light-scattering properties. Biol. Reprod. p 86-107, 2012. [Doi: 10.1095/biolreprod.111.093161](https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.093161)
- 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 5:1–9, 2010. [doi: 10.1371/journal.pone.0010740](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010740)
- LACERDA, S. M. S. M.; COSTA, G. M. J.; SILVA, M. A. CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; PEIXOTO, T. D.; RESENDE, R. R; FRANÇA, L. R. Phenotypic characterization and *in vitro* propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. General and Comparative Endocrinology 192, p. 95-106, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.013>
- 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, v3,n2,p. 146-159, 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228800805_Germ_cells_transplantation_in_fish_The_Nile-tilapia_model. Acesso em: 02/11/2019.
- LACERDA, S. M. S. N.; COSTA G. M. J.; SEGATELLI, T. M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y.; MORITA, T.; YOSHIZAKI, G.; FRANÇA L. R. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. Fish Physiol Biochem. 2012. DOI 10.1007/s10695-012-9606-4
- MAJHI S. K.; HATTORI R. S. ; YOKOTA M.; WATANABE S.; STRÜSSMANN C. A. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germlines. PLoS One. 4:E6132 , 2009. [Doi: 10.1371/journal.pone.0006132](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006132)
- MAJHI S. K; HATTORI R. S; RAHMAN, S. M.; STRUSSMANN, C. A. Surrogate production of eggs and sperm by Intrapapillary transplantation of germ cells in Cytoablated adult fish. PLoS One 9(4): (2014) e95294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095294>

- MANNING, M. J.; NAKANISHI, T. The specific immune system: cellular defences. In: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), The Fish Immune System. Academic Press, New York, p. 159–205, 1996. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60274-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60274-5)
- MANNING, M.J.; NAKANISHI, T. The specific immune system: cellular defences. The Fish Immune System, Academic Press, New York, p. 159-205, 1996. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60274-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60274-5)
- OKUTSU T.; SHIKINA S.; KANNO M, TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science. 317:1517, 2007. DOI:10.1126/science.1145626
- OKUTSU T.; SUZUKI K.; TAKEUCHI Y.; TAKEUSHI T.; YOSHISAKI G. Testicular germ cell can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. PNAS., 103, p. 2725-2729, 2006. Doi:10.1073/pnas.0509218103
- RODRIGUES, M. da SILVA; SILVA, D. H. de SIQUEIRA; QUIRINO, P. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The efficiency of spermatogenesis and the support capacity os Sertoli cells in Characiformes. Theriogenology, v 103, p. 149-152, 2017. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.025
- RODRIGUEZ-SOSA J. R.; DOBSON H.; HAHNEL A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. Theriogenology. 66, p. 2091–2103, 2006. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.039
- SEKI, S.; KISANA, K.; LEE, S. IWASAKI, Y.; YAGISAWA, M.; ISHIDA, M.; HIRATSUKA, T.; SASADO, T.; NARUSE, K.; YOSHIZAKI, G. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. Scientific Reports 7, n° 43185- 2017. <https://doi.org/10.1038/srep43185>
- SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SAITO, T.; SANTOS-SILVA, A. P.; COSTA, R. S.; YASUI, G. S. Biotechnology applied to fish reproduction: tools for conservation. Fish Physiol Biochem.44, p. 1469-1485, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0506-020>
- SOUZA, U.N.; FELIZARDO, V. O.;, FREITAS, R. T. F.; MELO, C. C. V.; FERREIRA, M. R.; REIS-NETO, R. V. Influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas de tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas à indução hormonal com hCG. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.68, n.1, p.215-223, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-7716>
- TAKEUCHI Y, YOSHIZAKI G, TAKEUSHI T. Surrogate broodstock produces salmonids. Nature. 430, p. 629- 630, 2004. <https://www.nature.com/articles/430629a>
- TAKEUCHI Y.; YOSHIZAKI G.; TAKEUSHI T.. Generation of live fry from intraperitoneally primordial germ cells in rainbow trout. Biol Reprod., 69, p. 1142-1149, 2003. Doi: 10.1095/biolreprod.103.017624
- YOSHIZAKI G, LEE S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. Stem Cell Research 29, p. 103-110, 2018. Doi: 10.1016/j.scr.2018.03.015
- YOSHIZAKI, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S. ; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. Development. 137, p. 1227–1230, 2010. Doi:10.1242/dev.044982

Atividades	Tempo (Semestres)									
Levantamento bibliográfico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Cadastro do projeto na UFERSA	x									
Aprovação junto ao departamento	x									
Solicitação de autorização CEUA	x									

Solicitação de licenças (IBAMA/ICMBio/SisGen)	x									
Adequação das áreas para manutenção dos peixes (setor de aquicultura e laboratórios- TRIMA, SerTãoMar)	x									
Realização das capturas e aquisição dos peixes	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Realização dos projetos do Programa	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Publicação de artigos		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Orientações (Graduação, Pós-graduação)		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Envio de relatório anual para os órgãos (quando exigirem)			x		x		x		x	x
Concorrer as editais de captação de recursos	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Busca de convênios e parcerias	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Depósito de patentes				x	x	x	x	x	x	x
Aquisição de material	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Seleção e atuação de bolsistas da graduação e da pós-graduação	x	X	x	x	x	x	x	x	x	x
Participação em eventos			x	x	x	x	x	x	x	x