

**MISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PEIXES CONTINENTAIS
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PIBIC/ICMBio**

RELATÓRIO FINAL

QUIMERISMO E PROPAGAÇÃO MEDIADA EM PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus*.

**Bolsista: Tamiris Disselli
Orientador: Dr. José Augusto Senhorini
Co-orientador: Dr. George Shigueki Yasui**

**PIRASSUNUNGA-SP
JULHO DE 2013**

ÍNDICE

RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS	VI
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 QUIMERISMO EM PEIXES	8
2.1 Definição e potencialidades.....	8
2.2 Obtenção de quimeras germinativa em peixes	10
2.3 Esterilização do embrião receptor	12
3 OBJETIVOS.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Origem dos animais e obtenção dos gametas	13
4.2 Remoção química do córion.....	14
4.3 Meios de cultura para embriões sem córion	15
4.4 Esterilização da espécie receptora	15
5 RESULTADOS.....	16
5.1 Remoção química do córion	16
5.2 Meios de cultura para embriões sem córion	17
5.3 Esterilização da espécies receptora.....	17
6 DISCUSSÃO.....	19
7 AGRADECIMENTOS.....	20
8 ETAPAS E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PLANO DE TRABALHO.....	21
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

RESUMO

A região Neotropical concentra uma das ictiofaunas mais ricas do globo. No tocante as espécies de água doce, a família characidae é o maior grupo e é amplamente distribuída por toda a região Neotropical. Dentre os caraciformes, o gênero *Brycon sp.* é particularmente importante devido à sua importância econômica para a pesca continental como fonte de alimento. Este gênero engloba 17 espécies das quais 6 são consideradas ameaçadas (ver Livro Vermelho das Espécies em Extinção), enfatizando a adoção de estratégias de conservação como o quimerismo por transplante de células embrionárias. Esta ferramenta é interessante para a genética da conservação, pois a espécie receptora das células germinativas poderá produzir gametas da espécie doadora. Desse modo, o objetivo do presente trabalho é utilizar um receptor intra-genérico *Brycon cephalus* como receptor de células germinativas de espécies ameaçadas *B. insignis* e *B. orbignyanus*. Primeiramente, foram desenvolvidos protocolos de micromanipulação para as espécies doadoras e receptoras. Foi avaliada a remoção do córion empregando-se enzimas (tripsina, pepsina, pronase, papaína, bromelaína e tioglicolato de cálcio) e o córion foi removido utilizando pronase (0.03%) e tripsina (0.15%) para todas as espécies. No caso de *B. cephalus*, embriões decorionados foram cultivados em um meio de cultura desenvolvido nesse projeto (characin medium - 12 mM NaCl, 1 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM NaHCO₃). Após a remoção do córion utilizando pronase e tripsina, as taxas de eclosão foram $61.4 \pm 5.4\%$ e $59.2 \pm 38\%$, respectivamente. No grupo controle, no qual havia ovos intactos, a taxa de eclosão foi $82.4 \pm 0.8\%$. Estes resultados permitem protocolos de micromanipulação que serão realizados nas próximas etapas desse projeto.

ABSTRACT

The Neotropical region concentrates one of the richest ichthyofauna in the world. Regarding the freshwater species, the family characidae is the largest group and it is widely distributed in all Neotropical region. Among the characiforms, the genera *Brycon sp.* is particularly important because of its economical importance for inland fisheries for food supply. This genera comprises 17 species in which 6 are considered endangered (see "Red List of Endangered Species"), emphasizing the utilization of conservation strategies such as chimerism by transplantation of embryonic cells. This is a interesting tool for conservation genetics because the host species may produce gametes from donor species. So, the aim of this work is to use a intra-generic host *Brycon cephalus* as a host species for endangered species *B. insignis* and *B. orbignyana*. Firstly, we developed a micromanipulation procedures for donor and host species. We evaluate the removal of chorion by enzymes (trypsin, pepsin, pronase, papain, bromelain and calcium thioglycolate) and the chorion was successfully removed using pronase (0.03%) and trypsin (0.15%) for all the species. In the case of *B. cephalus*, dechorionated embryos were cultured in a culture medium developed in this project (characin medium - 12 mM NaCl, 1 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM NaHCO₃). After removal of chorion with pronase and trypsin and subsequent culture in this medium, the hatching rate was $61.4 \pm 5.4\%$ and $59.2 \pm 38\%$, respectively. In control group, in which intact eggs were used, the hatching rate was $82.4 \pm 0.8\%$. These results permits the micromanipulation protocols that will be performed in the following stages of this project.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimentos para obtenção de quimeras germinativas 10

Figura 2. Histograma de citometria de fluxo para detectar indivíduos triplóides 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Remoção química do córion.....16

Tabela 2. Cultura de embriões decorionados com tripsina e pronase.....17

Tabela 3. Fertilização, eclosão e percentual de triplóides em *B. cephalus*.....18

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Brycon* pertence à classe de peixes teleósteos, e representa mais de 70 espécies distribuídas pela região Neotropical. Algumas espécies do gênero *Brycon sp.* apresentam potencial para a aquicultura, conforme já constatado na piracanjuba (*B. orbignyanus*), matrinxã (*B. cephalus*), piraputanga (*B. opalinus*), piabanha (*B. insignis*). Em contraste, outras espécies ainda não foram inclusive domesticadas, caso da *B. vermelha* e *B. ferox*. As primeiras tentativas de propagação artificial nessas duas espécies foram realizadas recentemente no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio-Pirassununga). Embora as potencialidades zootécnicas e a importância ecológica dessas espécies de *Brycon*, seis delas (*B. opalinus*, *B. insignis*, *B. ferox*, *B. vermelha*, *B. orbignyanus*) já constam no Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção (MMA, 2009). Considerando que essas espécies são endêmicas de uma Bacia ou rio específico, e da crescente ação antrópica nos recursos hídricos, existe uma possibilidade evidente de perda definitiva desse patrimônio ictiogenético, antes mesmo de conhecermos aspectos da biologia básica ou consolidarmos estratégias de propagação artificial.

Estratégias de conservação já foram empregadas em algumas espécies como a propagação artificial (Andrade-Talmelli, 1998, 2001; Andrade e Yasui, 2003; Camargo *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2011; Narahara *et al.*, 2002; Romagosa *et al.*, 2001a), levantamento da biologia reprodutiva (Ganeco *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2006) e genética (Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2010). Devido a iminente redução dos estoques naturais, também foram adotadas estratégias para a constituição de bancos genéticos através da criopreservação do sêmen (Murgas *et al.*, 2003; Viveiros *et al.*, 2012a, 2012b). O sêmen criopreservado pode ser efetivo na manutenção da variabilidade genética, visto que sêmen de vários machos podem ser estocados e posteriormente utilizados na fertilização artificial.

Contudo, em espécies já extintas ou em vias de extinção, a reconstituição dos peixes a partir do sêmen criopreservado deve ser realizada através de androgênese, uma técnica que pode gerar indivíduos unicamente a partir do genoma paterno. Embora factível, essa técnica resulta em baixíssima sobrevivência para a maioria das espécies, além de gerar problemas com a redução da variabilidade genética, maturação e proporção sexual, conforme descrito em nossos recentes trabalhos (Yasui *et al.*, 2010; Fujimoto *et al.*, 2010). Outro agravante é que, o sêmen criopreservado não preserva componentes maternos importantes como o DNA mitocondrial e o plasma germinativo.

A técnica mais promissora para a constituição de bancos genéticos é preservação de células germinativas primordiais, que podem ser transplantadas para um organismo receptor constituindo então uma quimera germinativa. A quimera germinativa resultante poderá então produzir gametas da espécie doadora, o que significa que uma espécie em extinção poderá ser reconstituída através do quimerismo e subsequente propagação mediada. Contudo, até onde se sabe, não há casos de linhagens germinativas da quimera na literatura indexada em espécies de peixes nativas, o que nos levou a elaborar o presente projeto.

2 Quimerismo em peixes

2.1 Definição e potencialidades

Após a fusão de pronúcleos de ambos, ovócito e espermatozóide, ocorre a formação do zigoto. Essa célula única passa por sucessivas divisões mitóticas até a formação de um organismo completo, ou seja, ocorre a diferenciação em tipos celulares mais especializados. Em peixes, existem pré-determinantes citoplasmáticos de origem materna (basicamente mRNA, grânulos polares, mitocôndrias e proteínas) conhecidos como plasma germinativo e que se distribuem assimetricamente durante as primeiras clivagens (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Braat *et al.*, 2000; Shinomiya *et al.*, 2000, Yoshizaki *et al.*, 2000a; Hashimoto *et al.*, 2004). Essa forma de distribuição heterogênea origina dois tipos celulares: a linhagem

germinativa (contendo o plasma germinativo) e a linhagem somática. Entre os estágios de blástula e gástrula, as células que possuem o plasma germinativo se diferenciam em células germinativas primordiais (CGP), que são precursoras dos gametas (Braat *et al.*, 1999a; Takeuchi *et al.*, 2003).

Células embrionárias podem ser transplantadas de um indivíduo para outro, e o organismo resultante da coexistência de células exógenas e endógenas é conhecido como quimera. No organismo receptor, as células transplantadas podem originar as linhagens germinativas e somáticas (Nilsson e Cloud, 1992; Chen *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004). Caso sejam transplantadas células germinativas primordiais (CGP) ou suas precursoras, essas poderão se diferenciar, originando então os gametas provenientes do organismo doador (Fig. 1). Assim, células germinativas de peixes de difícil manejo reprodutivo podem ser transplantadas para embriões de espécies com protocolos de reprodução bem estabelecidos. Além disso, a linhagem germinativa apresenta potencialidades para a preservação dos recursos genéticos (Nakagawa *et al.*, 2002; Yoshizaki *et al.*, 2003). Outra forma de quimerismo utilizando transplante de células pode ser realizado utilizando-se espermatogônias (Okutsu *et al.*, 2006; Lacerda *et al.*, 2006), embora não seja o foco do presente estudo.

Conforme destacado por alguns autores (Takeuchi *et al.*, 2002; Yamaha *et al.* 2006) entre as principais potencialidades do quimerismo germinativo para a aquicultura estão: controle do ciclo reprodutivo, entre espécies de ciclo longo e curto; controle da produção de ovos entre espécies de grande e pequeno porte; preservação da variabilidade genética, utilizando células germinativas multi-parentais; preservação dos estoques genéticos contra patógenos, utilizando linhagens resistentes como receptoras; produção de peixes marinhos a partir de espécies de água doce.

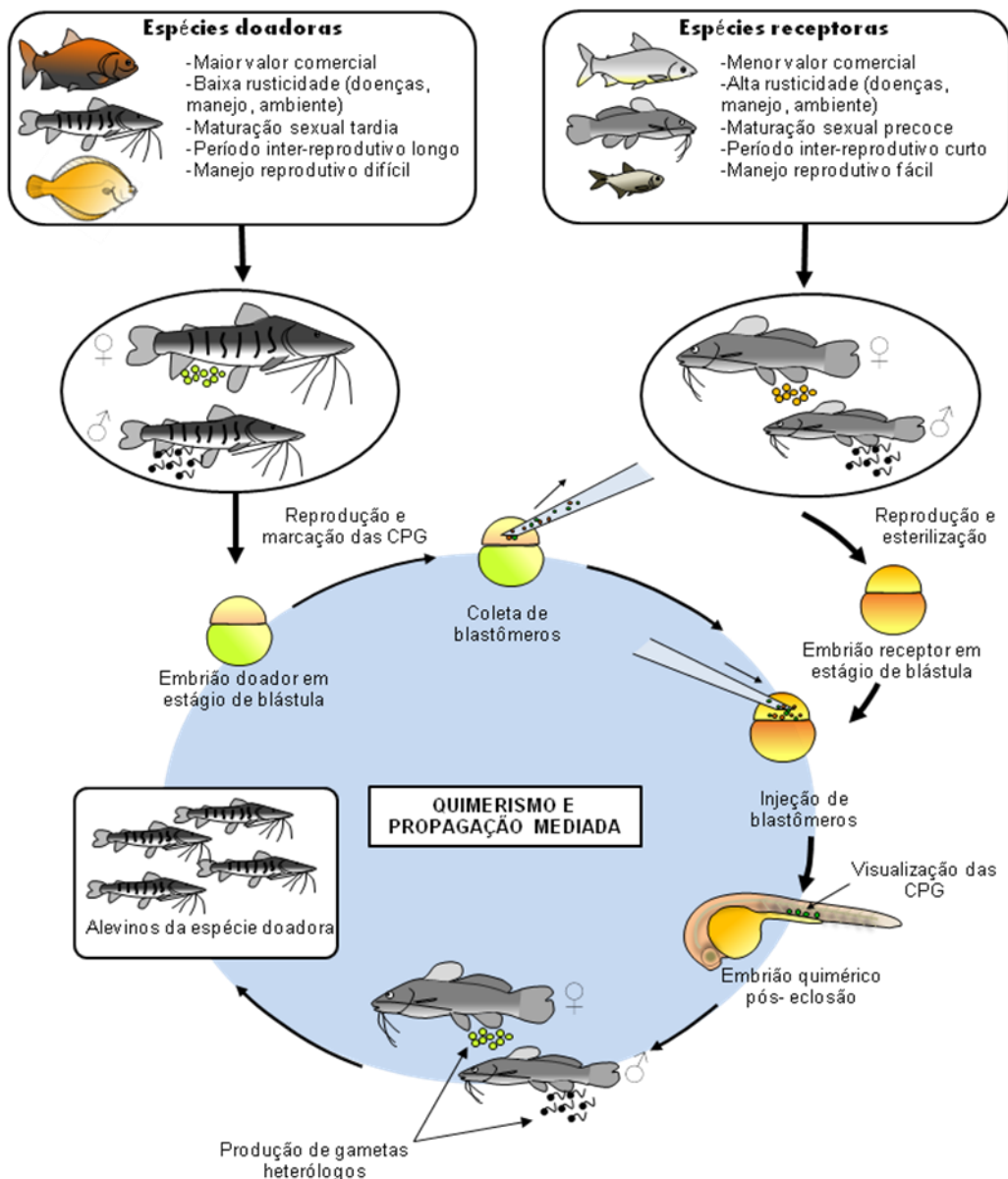


Fig 1. Procedimentos utilizados na produção de quimeras germinativas, com finalidade de propagação mediada.

2.2 Obtenção de quimeras germinativa em peixes

Existem alguns casos de linhagens germinativas da quimera, sendo a maioria delas transplantes de células intra-específicas. Em *Misgurnus anguillicaudatus*, Nakagawa *et al.* (2002) obtiveram quimeras utilizando exemplares de coloração cinza como doador (fenótipo dominante) e receptores de coloração laranja (fenótipo recessivo). Um em cada quatro animais quiméricos produziu gametas heterólogos, característica confirmada através de testes

de progênie. Utilizando metodologia similar, os índices de quimerismo foram de 17,9 % em *Danio rerio* (Lin *et al.*, 1992), 16,7 % em *Oryzias latipes* (Wakamatsu *et al.*, 1993) e 31,5 % para *Oncorhynchus mykiss* (Takeuchi *et al.*, 2001). Em “zebrafish” os índices de sobrevivência e quimerismo foram menores que 4% (Ma *et al.*, 2001; Cardona-Costa *et al.* 2009). Em trutas (*O. mykiss*), os índices de quimerismo foram de 16% no caso de machos e 14% para fêmeas (Takeuchi *et al.* 2003 e 2004). Para a mesma espécie, Kobayashi *et al.* (2007) utilizando CGP criopreservadas, a produção de gametas heterólogos ocorreu apenas em 5,6 - 12,1 %, embora a contribuição genética à F1 resultante de apenas 0,09 - 16,3 %. Yamaha *et al.* (2001) transplantaram blastômeros de *Carassius auratus langsdorfii* para *Carassius auratus* e das quimeras obtidas verificaram contribuição de genética nos descendentes de 3,1 a 89,3%.

Quimeras interespecíficas foram obtidas em transplantes de CGP provenientes de *Oncorhynchus mykiss*, *O. masou* e *Salmo trutta* para embriões de *O. mykiss* (Yoshizaki *et al.* 2005). Nos transplantes intra-específicos (*O. mykiss* x *O. mykiss*), 12,3 % dos animais transplantados apresentaram CGP incorporadas às cristas genitais aumentando para 24,4 % no quimerismo intragenérico (*O. masou* x *O. mykiss*) e 9,4% no transplante intergenérico (*S. trutta* x *O. mykiss*). Yamaha *et al.* (2003) utilizaram *Carassius auratus* como espécie doadora e híbridos estéreis de *C. auratus* x *Cyprinus carpio*, como receptores, e verificaram que alguns peixes quiméricos foram capazes de produzir espermatozóides da espécie doadora.

Saito *et al.* (2008) obtiveram animais quiméricos utilizando várias espécies doadoras (*Clupea pallasii*, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Carassius auratus*, *Danio albolineatus*, *Leucopsarion petersii*) tendo como embrião receptor o *Danio rerio*. No caso do *Danio albolineatus*, que é a espécie filogeneticamente mais próxima da espécie receptora, ocorreu a formação de gametas heterólogos (ovócitos e espermatozóides) viáveis, confirmados por fertilização natural e artificial. Interessantemente, os gametas femininos apresentaram o

tamanho natural da espécie receptora, embora o polo animal tenha sido constituído geneticamente pela espécie doadora. Esse foi o primeiro relato de produção heteróloga de ovócitos por quimerismo interespecífico. O *Danio rerio* foi capaz de produzir espermatozóides viáveis em *Misgurnus anguillicaudatus* e *Carassius auratus*. Esses dados corroboram com as afirmações de Yamaha *et al.* (2006) e Yoshizaki *et al.* (2003), que afirmam que o quimerismo apresenta maiores chances de sucesso quando realizado em espécies filogeneticamente próximas.

2.3 Esterilização do embrião receptor

Após o transplante de células e diferenciação em CGP, poderão coexistir no embrião receptor CGP exógenas (transplantadas) e endógenas. Ambas são capazes originar a linhagem germinativa, e em alguns casos os peixes podem produzir gametas da espécie doadora e receptora simultaneamente (Lin *et al.*, 1992; Yamaha *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2001 e 2003; Kobayashi *et al.*, 2007). Na maioria desses casos, a transmissão germinativa costuma ser baixa (Lin *et al.*, 1992; Takeuchi *et al.*, 2001 e 2003; Kobayashi *et al.*, 2007). Entretanto, para a propagação mediada objetiva-se apenas a produção de gametas heterólogos. De modo a contornar esse problema, podem ser utilizadas técnicas de esterilização do embrião receptor. Entre as principais metodologias empregadas, estão a utilização de RNA-anti-sense (Ciruna *et al.*, 2002), e a utilização de peixes estéreis (híbridos e/ou triplóides) (Nilsson e Cloud, 1993; Yamaha *et al.*, 2003).

O oligonucleotídeo anti-sense, é capaz de silenciar a expressão gênica necessária para a migração ou manutenção das CGP do organismo receptor (Weidinger *et al.*, 2003; Kurokawa *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Embora factível (Ciruna *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2008), essa tecnologia se encontra sob o controle de patente, pode exigir protocolos espécie-específicos e não permite a produção massal de peixes estéreis, podendo também causar

desvios na proporção sexual (Kurokawa *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2008). A utilização de receptores estéreis híbridos ou triploides é interessante, pois permite a produção massal de peixes estéreis (Chevassus, 1983; Bartley *et al.*, 2001; Tiwary *et al.*, 2004) embora a esterilidade não seja confirmada para algumas poucas espécies (Fujimoto *et al.*, 2008, 2010; Arias-Rodriguez *et al.*, 2009, 2010).

3 OBJETIVOS

- Protocolos de micromanipulação em peixes do gênero *Brycon sp.*, incluindo os processos de decorionização, cultivo de embriões decorionados, micro-injeção (corantes) e transplante de células.
- Descrição detalhada do desenvolvimento embrionário das espécies doadoras e receptoras, incluindo os principais estágios da ontogenia, em diferentes temperaturas, e informações relevantes como o tamanho e intervalo de geração de células.
- Protocolos de esterilização da espécie doadora através de triploidia.
- Protocolos para a obtenção de quimeras germinativas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos animais e obtenção dos gametas

O trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA – ICMBio localizado a 21°55'48" latitude sul 47°22'28,1" longitude oeste.

Foram utilizados reprodutores de piracanjuba *Brycon orbignyanus* e matrinxãs *B. cephalus* adultos, mantidos em cativeiro no CEPTA. A piracanjuba é oriunda de reprodução realizada de 10 casais selvagens na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da CESP de Jupiá - SP. Os peixes foram selecionados, levados para o laboratório de reprodução e submetidos ao processo reprodutivo conforme Ceccarelli *et al.* (2005), entretanto os machos já estavam espermiando sobre leve pressão e não foram induzidos hormonalmente.

4.2 Remoção química do córion

Utilizando-se a solução para caraciformes obtida acima, foram testadas várias soluções para remoção do córion, basicamente empregando-se enzimas proteolíticas para digestão. Foram testadas as seguintes substâncias: papaína 4%, tripsina 0.6%, bromelaína 1%, pepsina 3%, pronase 0,03% e tioglicolato de cálcio 4%. Ovos recém fertilizados foram imersos nas soluções mencionadas acima e observados ao estereomicroscópio para verificar a digestão do córion. O córion foi observado nos tempos de 5, 10 e 15 minutos após a fertilização (tempo ideal para iniciar a micromanipulação antes da primeira clivagem). Para verificar a digestão, foi criada uma escala subjetiva conforme descrito na tabela 2.

De acordo com a mesma tabela, foi possível remover o córion em todas as espécies testadas, utilizando-se tripsina e pronase. Essa informação, aliada ao meio de cultura obtido anteriormente, nos permitiu prosseguir para a próxima etapa, de remoção do córion com enzimas e subsequente cultura dos embriões sem córion.

4.3 Meios de cultura para embriões sem córion

Ovos recém fertilizados de *Brycon cephalus*, e *B. orbignyanus* foram divididos em placas de Petri contendo as seguintes soluções: Eagle-MEM (Sigma), dPBS (Sigma), solução salina de Hanks, solução de Holtfreter (100%, 75%, 50% e 25%) e solução de Ringer. O córion foi removido utilizando-se pinças finas e os embriões sem córion foram transferidos para placas de Petri contendo a mesma solução, adicionando-se 100 U.I./mL de ampicilina e 50 U.I./mL de estreptomicina. Foram acompanhados os desenvolvimentos embrionários nos estágios subsequentes. Nas soluções com concentração fisiológica (dPBS, Ringer, MEM, Hanks) todos os embriões morreram no estágio de blástula (dados não apresentados). Na solução de Hanks, que possui baixa osmolaridade, o percentual de sobrevivência aumentou, indicando que para peixes reofílicos deve ser empregada uma solução de baixa osmolaridade.

Desse modo, por tentativa e erro, foi criada em nosso projeto uma solução universal para caraciformes - "characin medium" (12 mM NaCl, 1 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM NaHCO₃) que estão sendo testadas no período reprodutivo atual, apresentando resultados satisfatórios para *Brycon cephalus* e *Brycon orbignyanus* (ver seção de resultados).

4.4 Esterilização da espécie receptora

A espécie *Brycon cephalus* será empregada como receptora de células germinativas, e um dos objetivos é desenvolver indivíduos triplóides estéreis nessa espécie. Ovos recém-fertilizados de *Brycon cephalus* foram divididos em alíquotas, e após 2 minutos após a fertilização (mpf), receberam tratamento térmico conforme a seguir: 38, 40 e 42°C por 2 minutos e 0-3°C por 30 minutos. Após o tratamento térmico, os ovos foram transferidos para incubadoras do tipo funil. Uma parcela sem tratamento térmico foi incubada nas mesmas condições dos demais tratamentos, servindo como controle. Foi mensurada o percentual de

fertilização (estágio de blástula) e eclosão, com subsequente contagem dos indivíduos normais e anormais. Das larvas recém-eclodidas e dos peixes parentais, foi mensurada a quantidade de DNA por citometria de fluxo (Partec CyFlow Plody Analyzer, Alemanha), utilizando 2 etapas (enucleação e quantificação por fluorescência em DAPI - ver Yasui *et al.*, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 Remoção química do córion

Conforme observado na Tabela 1, embora tenham sido avaliadas várias substâncias para a remoção enzimática do córion em *Brycon orbignyianus* e *B. cephalus*, apenas a tripsina e a pronase foram efetivas para a remoção total do córion, digerindo o córion em menos de 5 minutos. Essas duas enzimas foram selecionadas para avançar para a próxima etapa para avaliar qual a efetiva no tocante ao percentual de sobrevivência dos embriões sem córion.

Tabela 1. Tratamentos para remoção do córion. Após a fertilização, ovos foram imersos em 6 substâncias diferentes e foram observados os níveis de digestão do córion (parcial ou total) em 5, 10 e 15 minutos de incubação. Números entre parênteses denotam o tempo para a digestão total do córion.

Enzima	<i>Brycon orbignyianus</i>			<i>Brycon cephalus</i>		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
Tripsina 0.6%	***** ²	*****	*****	***** ^{0.5}	*****	*****
Pepsina 3%	***	***	***	**	**	***
Bromelaína 1%	****	****	****	**	**	**
Papaína 4%	**	**	**	**	**	***
Pronase 0.03%	***** ⁴ 5	*****	*****	***** ^{0.5}	*****	*****
Tioglicolato 4%	*	**	**	**	**	**

* sem alteração no córion.

** córion mais flácido, podendo ser deslocado com toque mecânico.

*** córion bastante flácido, embora podendo ser deslocado por toque mecânico.

**** digestão do córion visível na superfície, ovos não podem ser deslocados por toque mecânico devido à flacidez excessiva do córion.

***** digestão completa (ausência).

5.2 Meios de cultura para embriões sem córion

Conforme explícito na Tabela 2, a pronase e tripsina apresentaram resultados similares em relação à fertilização ($93.6 \pm 6.0\%$ e $96.6 \pm 2.7\%$, respectivamente) e eclosão ($61.4 \pm 5.4\%$ e $59.2 \pm 38.0\%$), embora os valores de eclosão tenham sido inferiores ao controle ($82.4 \pm 0.8\%$). Contudo, quando observados os resultados de indivíduos normais e anormais, a tripsina apresenta maior percentual de indivíduos normais ($48.3 \pm 20.1\%$), similar ao encontrado no controle ($53.2 \pm 0.3\%$). Contudo, enfatizamos que os resultados expressos acima são provenientes de apenas duas repetições, e outros experimentos estão em plena execução.

Tabela 2. Cultura de embriões de matrinxã *Brycon cephalus* após a remoção do córion com pronase (0.03%) e tripsina (0.15%) dissolvidas em solução para caracídeos. Controle se refere a embriões intactos, com córion. Os ovos recém-fertilizados foram incubados em cada uma das soluções e observados o tempo de digestão do córion e os estágios de desenvolvimento.

Tratamento	Fertilização	Eclosão	Normal	Anormal
Pronase (0.03%)	$93.6 \pm 6.0\%$	$61.4 \pm 5.4\%$	$31.9 \pm 4.0\%$	$68.1 \pm 4.0\%$
Tripsina (0.15%)	$96.6 \pm 2.7\%$	$59.2 \pm 38.0\%$	$48.3 \pm 20.1\%$	$51.7 \pm 20.1\%$
Controle	$97.9 \pm 1.4\%$	$82.4 \pm 0.8\%$	$53.3 \pm 0.3\%$	$46.74 \pm 0.2\%$

5.3 Esterilização da espécie receptora

Os dados explícitos na Tabela 3 evidenciam que os tratamentos que empregaram choques quentes são mais efetivos para *Brycon cephalus*. A 0°C , apenas $0.5 \pm 0.7\%$ dos animais sobreviveram até o estágio de eclosão, todos triplóides. Quanto ao tratamento de 42°C , nenhum animal sobreviveu até o estágio de eclosão. Já a 38°C e a 40°C a sobrevivência foi melhor ($46.0 \pm 20.1\%$ e $61.2 \pm 52.8\%$, respectivamente), embora ainda inferiores ao controle ($74.1 \pm 24.6\%$). A 38°C , baixo número de triplóides foi encontrado (1 em 39). Contudo, no tratamento a 40°C , 100% de indivíduos triplóides foi encontrado (n=40).

Tabela 3. Fertilização, eclosão e ploidia de larvas de *Brycon cephalus*, induzidas por tratamento térmico. Os dados se referem a duas repetições (terceira repetição em análise)

Tratamento	Fertilização	Eclosão	Normal	Anormal	Ploidia		n
					2n	3n	
0°C	57.9 ± 0.1%	0.5 ± 0.7%	0.0 ± 0.0%	100.0 ± 0.0%	0	3	3
38°C	85.9 ± 16.1%	46.0 ± 20.1%	58.9 ± 29.2%	41.1 ± 28.2%	39**	1*	40
40°C	82.4 ± 20.5%	61.2 ± 52.8%	28.0 ± 21.9%	72.0 ± 21.9%	0	40***	40
42°C	82.2 ± 8.9%	0.0 ± 0.0%	-	-	-	-	-
Controle	95.74 ± 3.0%	74.1 ± 24.6%	86.9 ± 9.8%	13.1 ± 9.8%	40	0	40

*hiper-triplóide; **2n-3n mosaico; ***1 mosaico e um peixe hipo-triplóide encontrados.

A ploidia dos animais foi confirmada através de citometria de fluxo, sendo que amostras de animais triplóides e diplóides foram misturadas para efeito comparativo, exibindo o padrão de DNA relativo explícito na Fig. 2.

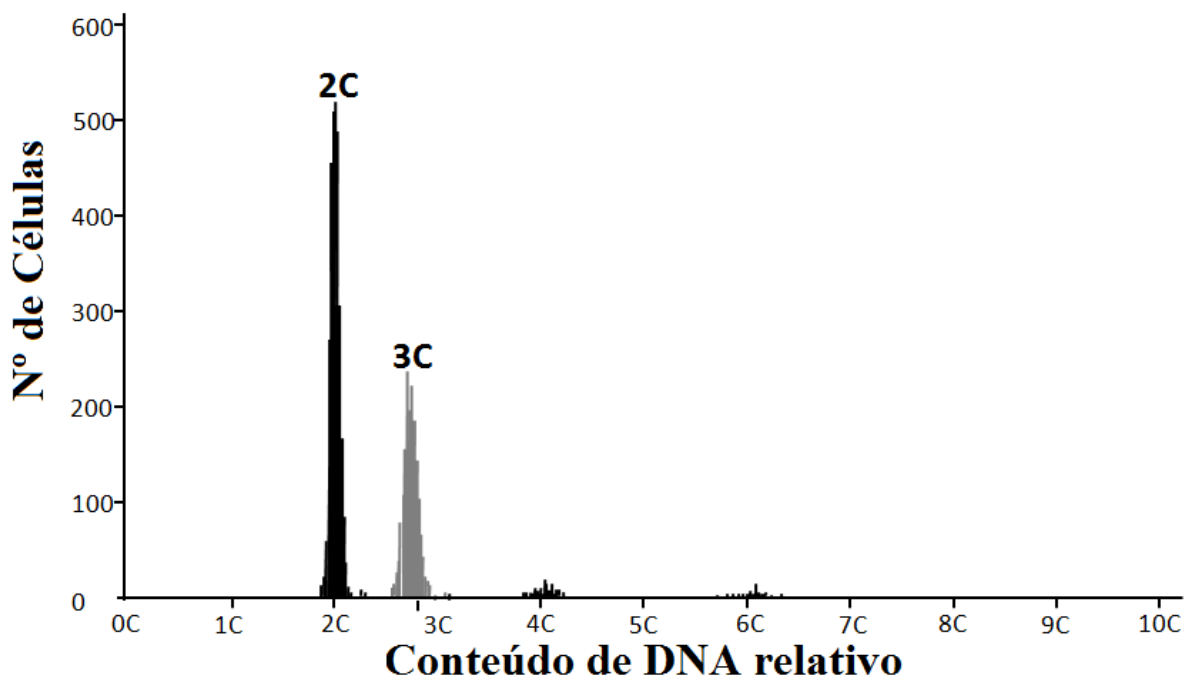


Figura 2. Conteúdo de DNA relativo de peixes diplóides (pico negro) e triplóides (pico cinza). Amostras de peixes diplóides e triplóides foram misturadas para verificar a quantidade de DNA relativo baseado em fluorescência de diamidino-fenilindole-dihidrocloro (DAPI) detectados por citometria de fluxo (Partec CyFlow Ploidy Analyzer).

Os peixes triplóides foram transferidos para tanques para crescimento, e o objetivo é coletar dados adicionais como o crescimento, diâmetro nuclear dos eritrócitos, citogenética, e finalmente realizar a histologia das gônadas para confirmar a esterilidade dos indivíduos triplóides.

Os dados explícitos acima são provenientes de duas repetições apenas, outros experimentos estão sendo conduzidos para aumentar o número de repetições.

6 DISCUSSÃO

Embora ainda com dados preliminares (a maioria dos experimentos conta apenas com duas repetições), este é o primeiro relato de cultura de embriões utilizando-se meio específico para espécies Neotropicais, fato que nos permitirá prosseguir com a micro-manipulação de embriões. Com o tratamento enzimático, foi possível remover o córion em todas as espécies testadas, utilizando-se tripsina e pronase. Essa informação, aliada ao meio de cultura obtido em nosso projeto, nos permitiu prosseguir para a próxima etapa, de remoção do córion com enzimas e subsequente cultura dos embriões sem córion.

No tocante à triploidização da espécie receptora, os dados foram confirmados por citometria de fluxo, que é o método mais preciso para esse tipo de verificação, e ainda teremos a confirmação por análise cariotípica e diâmetro nuclear dos eritrócitos. Posteriormente, quando os peixes triplóides atingirem a maturação sexual, também realizaremos a análise histológica das gônadas, para verificação da esterilidade dos peixes triplóides. Os peixes triplóides estéreis de *Brycon cephalus* serão então receptores de células germinativas de *B. insignis* e *B. orbignyanus*, e a utilização desse receptor estéril garantirá apenas a gametogênese a partir células transplantadas (Yamaha et al., 2006, Yasui et al., 2011)).

Embora ainda seja necessário dados complementares, como a descrição detalhada do desenvolvimento embrionário, a caracterização histológica das células germinativas dos peixes triplóides e a rastreabilidade das Células Germinativas Primordiais (PGC), os dados encontrados são bem promissores e inéditos, com potencial de publicação em periódicos de alto impacto.

7 AGRADECIMENTOS

Aos Drs. José Augusto Senhorini e George Shigueki Yasui - pela dedicação, paciência, carinho, amizade e por me incentivar sempre a seguir em frente.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, CEPTA/ICMBio por me receber sempre de portas abertas e permitir este grande aprendizado.

Agradeço ao ICMBio/PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa.

8 ETAPAS E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PLANO DE TRABALHO

Etapa 1 – Realização de levantamento bibliográfico (Em andamento).

Etapa 2 – Triploidização da espécie receptora (Parcialmente concluída)

Etapa 3 – Obtenção de protocolos de micromanipulação (Parcialmente concluída)

Etapa 4 – Verificação do desenvolvimento embrionário (Não iniciada)

Etapa 5 - Interpretação dos resultados. (Iniciada)

Etapa 6 – Elaboração do relatório final e encaminhamento do trabalho para publicação. (Não iniciada)

Etapas	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Etapa 1</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
<i>Etapa 2</i>		x	x	x	x	x	x	x	x	X	X	
<i>Etapa 3</i>		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Etapa 4</i>						x	x	x	x	x	x	
<i>Etapa 5</i>										x	x	X
<i>Etapa 6</i>										x	x	x

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade-Talmelli EF, Fenerich Verani N, Verani JR (1998) Fator de condição relativo (Kn): um critério para selecionar fêmeas de piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) (Pisces: bryconinae), para indução reprodutiva. Boletim do Instituto de Pesca 25: 95 - 99
- Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Fenerich Verani N (2001) Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. Boletim do Instituto de Pesca 27(2): 149 - 154.
- Arias-Rodriguez L, Yasui GS, Kusuda S, Arai K, (2009) Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus loach*. Genetica 136: 49-56.
- Arias-Rodriguez L, Yasui GS, Kusuda S, Arai K, (2010) Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus loach*. Genetica 136: 49-56.
- Bartley DM, Rana K, Immink AJ (2001) The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. Rev Fish Biol Fisher 10: 325–337.
- Braat AK, Speksnijder JE, Zivkovic D (1999a) Germ line development in fishes. Int. J. Dev. Biol. 43: 745–760.
- Braat AK, van deWater S, Goos H, Bogerd J, Zivkovic D (2000) Vasa protein expression and localization in the zebrafish. Mech. Dev. 95: 271–274.
- Camargo ACS, Zaiden SF, Urbinati EC (2008) Desenvolvimento gonadal de fêmeas de matrinxã, *Brycon amazonicus*, submetidas a restrição alimentar. Ciencia Rural 38(4)1105-1110.
- Cardona-Costa J, Francisco-Simão M, Garcia-Ximénez (2009) Can vitrified zebrafish blastomeres be used to obtain germ-line chimaeras? CryoLetters 30 (6): 422-428.
- CECCARELLI, P. S. ; SENHORINI, J. A. ; REGO, R. F. . Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes,1849). In: Bernardo baldisserotto; Levy Carvalho Gomes. (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 1 ed. Santa Maria/Rs: Editora da Universidade Federal de santa Maria, 2005, v. unico, p. 121-147.
- Chen S-L, Ye H-Q, Sha Z-X, Hong Y (2003) Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas. J. Fish Biol. 63: 795-805.
- Chevassus B (1983) Hybridization in fish. Aquaculture 33: 245–262.
- Ciruna B, Weidinger G, Knaut H, Thisse B, Thisse C, Raz E, Schier AF (2002) Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:14919–14924.
- Dias DC, Furlanet FPB, Ayroza LMS, Tachibana L, Leonardo AFG, Correa CF, Romagosa E, MJT Ranzani-Paiva (2011) Utilização de probiótico na dieta de reprodutoras de matrinxã (*Brycon amazonicus*) Bol. Inst. Pesca, 37(2): 135 – 141, 2011
- Fujimoto T, Yasui GS, Hayakawa M, Sakao S, Yamaha E, Arai K (2010) Reproductive capacity of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa of a natural tetraploid male. Aquaculture 308:S133-S139.
- Fujimoto T, Yasui GS, Yoshikawa H, Yamaha E Arai K (2008) Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. J. Appl. Ichthyol. 24: 430-437.
- Ganeco LN, Nakaghi LSO, Urbinati EC, Dumont Neto R, Vasques LH (2001) Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. Boletim do Instituto de Pesca 27(2): 131 - 138.
- Gonçalves TL, Bazzoli N, Brito MFG (2006) Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) (Pisces: Characidae) in the São Francisco river, Minas Gerais, Brazil. Braz. J. Biol., 66(2A): 513-522

- Hashimoto Y, Maegawa S, Nagai T, Yamaha E, Suzuki H, Yasuda K, Inoue K (2004) Requirement of localized maternal factors for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* 268: 152–161.
- Kobayashi T, Takeuchi Y, Takeuchi T, Yoshizaki G (2007) Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol Repr Dev* 74:207-213.
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Silva SGB, Homem CSP, França LR (2006) Germ cell transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Anim. Reprod.* 3:146-159.
- Lin S, Long W, Chen J, Hopkins N. (1992) Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4519–4523.
- Liu LX, Hong N, Xu HY, Li MY, Yan Y, Purwanti Y, Yi M, Li Z, Wang L, Hong Y (2009) Medaka *dead end* encodes a cytoplasmic protein and identifies embryonic and adult germ cells of both sexes. *Gene Expr Patterns* 9:541-548.
- Ma C, Fan L, Ganassin R, Bols N, Collodi P (2001) Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2461–2466.
- Matsumoto CK, Hilsdorf AWS. (2009) Microsatellite variation and population genetic structure of a Neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology* 7:395-402.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção. Ângelo Barbosa Monterio Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia (Eds). – 1.ed – Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2009. 2v. 1420 p.
- Murgas LDS, Franciscatto RT, Santos AGO (2003) Avaliação Espermática Pós-Descongelamento em Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *R. Bras. Zootec.* 32(6):1810-1814.
- Nakagawa M, Kobayashi T, Ueno K (2002) Production of germline chimera in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and proposal of new method for preservation of endangered fish species. *J. Exp. Zool.* 293: 624–631.
- Narahara MY, Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Godinho HM (2002) Reprodução induzida da pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. *R. Bras. Zootec* 31(3):1070-1075.
- Nilsson EE, Cloud JG (1993) Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres. *Aquat. Living Resour.* 6: 77–80.
- Nilsson EE, Cloud JG (1993) Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9425-9428.
- Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Takeuchi T, Yoshizaki G (2006) Testicular germ cell can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 21: 2725-2729.
- Olsen LC, Aasland R, Fjose A (1997) A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* 66: 95–105.
- Rodriguez-Rodriguez MP, Lopera-Barreto NM, Ribeiro RP, Povh JA, Vargas L, Sirol RN, Jacometo CB (2010) Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. *Pesq. Agropec. Bras.* 45(1):56-63.
- Romagosa E, Narahara MY, Borella MI, Fenerich-Verani N (2001a) Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. *Boletim do Instituto de Pesca* 27(2): 139 - 147.
- Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, Yamaha E (2008) Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Rep.* 78:159-166.

Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, Nagahama Y, Hamaguchi S (2000) The vasa-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 42: 317–326.

Takeuchi Y, Yoshizaki G, Kobayashi T, Takeuchi T (2002) Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol. Reprod.* 67: 1087–1092.

Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T (2001) Production of germline chimeras in rainbow trout by blastoderm transplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 59:380–389.

Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T (2003) Generation of live fry from intraperitoneally primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Repr.* 69: 1142-1149.

Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T (2004) Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430: 629-630.

Tanaka M, Yamaha E, Arai K. (2004) Survival capacity of haploid-diploid goldfish chimeras. *J. Exp. Zool.* 301A:491–501.

Tiwary BK, Kirubakaran R, Ray AK (2004) The biology of triploid fish. *Rev Fish Biol Fish* 14:391–402.

Viveiros ATM, Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Caneppele D (2012a) Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology* 78:361-368.

Viveiros, ATM, Maria AN, Amaral TB, Orfão LH, Isau ZA, Veríssimo-Silveira R (2012b) Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. *Aquaculture Research* 43:546-555.

Wakamatsu Y, Hashimoto H, Kinoshita M, Iwamatsu T, Hyodo-Taguchi Y, Tomita H, Sakaguchi M, Ozato K (1993) Generation of germ-line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 2:325–332.

Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, Dumstrei K, Wise C, Lovell-Badge R, Thisse C, Thisse B, Raz E (2003) dead end, a novel vertebrate germplasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol.* 13, 1429–1434.

Yamaha E, Kazama-Wakabayashi M, Otani S, Fujimoto T, Arai K (2001) Germ-line chimera by blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica* 111, 227–236.

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

Yamaha E, Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K (2006) Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. *J. Sea Res.* 58:8-22.

Yasui GS, Fujimoto T, Arai K (2010) Restoration of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. *Aquaculture*, 308:S140-S144.

Yasui GS, Fujimoto T, Sakao S, Abe S, Yamaha E, Arai K (2011) Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. *Journal of Animal Science*.

Yoon C, Kawakami K, Hopkins, N (1997) Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124: 3157–3166.

Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, Takeuchi T (2000a) Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* 55:364–371.

Yoshizaki G, Tago Y, Takeuchi Y, Sawatari E, Kobayashi T, Takeuchi T (2005) GFP-labeling of primordial germ cells using a non-transgenic method and its application for germ cell transplantation in Salmonidae. *Biol. Reprod.* 73, 88–93.

Yoshizaki G, Takeuchi Y, Kobayashi T, Takeuchi T (2003) Primordial germ cells: A novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 453–457.