

**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto
Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade PIBIC/ICMBio**



Relatório de Acompanhamento
(Ciclo 2022-2023)

**CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS-TRONCO
EM PEIXES CHARACIFORMES**

Nome da estudante de IC: Larissa Fabricio

Orientador: Cláudio Cazal de Araújo Lira Filho

Coorientadora: Doutoranda Gabriella Braga Carvalho

**Instituição do coorientador: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
USP São Paulo/SP**

Pirassununga

Março/2023

RESUMO

A região neotropical abriga a maior biodiversidade da ictiofauna conhecida, compreendendo duas ordens com ampla distribuição no Brasil, os Siluriformes, representados pelos bagres e cascudos, e a ordem Characiforme que inclui espécies importantes na aquicultura bem como um número significativo de espécies listadas em ameaça de extinção, devido a inúmeros fatores provocadas pelas ações antrópicas e que, portanto, necessitam de ações voltadas para a conservação afim de diminuir esses efeitos. A criação de bancos genéticos a partir da criopreservação de células germinativas, é uma ferramenta promissora para reconstituição e manutenção de espécies ameaçadas através do transplante de células germinativas tronco e posterior geração de quimeras em espécies de peixes nativos. O projeto objetiva avaliar o efeito de crioprotetores na preservação de células germinativas oogônias-tronco da espécie *Brycon orbignyanus*, testando diferentes concentrações com a finalidade de estabelecer um protocolo eficaz na escolha do melhor crioprotetor para posterior transplante do material germinativo em espécies receptoras. Para esse experimento, foram coletados ovários de *Brycon orbignyanus* e seguidamente fragmentados em 9 partes. Posteriormente, cada fragmento foi submetido na solução crioprotetora por 10 minutos sendo utilizado dois crioprotetores externos, propanodiol e dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 3 M, 4 M e 5 M. Após exposição aos crioprotetores, as amostras do tecido ovariano foram criopreservadas utilizando o método de vitrificação, através do congelamento rápido, e acondicionamento em nitrogênio líquido em -80°C. Foi realizado o descongelamento a 30°C de cada amostra e dissociamos o tecidos gonadal que em seguida passou pela dissociação enzimática com o objetivo de separar oogônias-tronco das demais células germinativas e células somáticas. Seguidamente, quantificamos a concentração de oogônias-tronco além da viabilidade através da câmara de Neubauer, que forneceram dados satisfatórios de maior media de viabilidade utilizando propanodiol a 3 M, considerado o mais eficaz na criopreservação, sendo obtidos cerca de 96,68% de viabilidade após descongelamento, podendo ser empregado para a conservação do material germinativo e ser utilizado como alternativa para espécies nativas que estão em perigo de extinção através de criobancos por tempos indefinidos.

Palavras-chave: Criopreservação, biotecnologia, conservação *ex situ*.

ABSTRACT

The Neotropical region is home to the greatest biodiversity of ichthyofauna known, comprising two orders with wide distribution in Brazil, the Siluriformes, represented by catfish and plecos, and the Characiforme order, which includes important species in aquaculture as well as a significant number of species listed as endangered. extinction, due to numerous factors caused by human actions and which, therefore, require actions aimed at conservation in order to reduce these effects. The creation of gene banks based on the cryopreservation of germ cells is a promising tool for the reconstitution and maintenance of threatened species through the transplantation of stem germ cells and subsequent generation of chimeras in native fish species. The project aims to evaluate the effect of cryoprotectants on the preservation of stem oogonia germ cells of the species *Brycon orbignyanus*, testing different concentrations with the aim of establishing an effective protocol for choosing the best cryoprotectant for subsequent transplantation of the germinal material into recipient species. For this experiment, *Brycon orbignyanus* ovaries were collected and then fragmented into 9 parts. Subsequently, each fragment was submitted to the cryoprotectant solution for 10 minutes using two external cryoprotectants, propanediol and dimethyl sulfoxide (DMSO), at concentrations of 3 M, 4 M and 5 M. After exposure to the cryoprotectants, the ovarian tissue samples were cryopreserved using the vitrification method, through rapid freezing, and packaging in liquid nitrogen at -80°C. Each sample was thawed at 30°C and the gonadal tissues were dissociated, which then underwent enzymatic dissociation with the aim of separating stem oogonia from other germ cells and somatic cells. We then quantified the concentration of stem oogonia in addition to viability through the Neubauer chamber, which provided satisfactory data on the highest average viability using 3 M propanediol, considered the most effective in cryopreservation, obtaining around 96.68% viability. after thawing, it can be used to conserve germinal material and be used as an alternative for native species that are in danger of extinction through cryobanks for indefinite times.

Keywords: Cryopreservation, biotechnology, *ex situ* conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do fracionamento das gônadas. Inicialmente com corte vertical e em seguida, horizontal.

Figura 2. Principais etapas da vitrificação. A) Transferência do nitrogênio líquido para caixa térmica de inox, B) fragmentos mergulhados em nitrogênio líquido e transferidos para criotubos e C) armazenamento em botijão de nitrogênio.

Figura 3. Trituração do tecido ovariano fragmentado de *B. orbignyana*. A) trituração utilizando duas lâminas de bisturi em movimentos contrários e B) a esquerda fragmento recém descongelado e a direita após trituração do tecido ovariano.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções crioprotetoras utilizadas para vitrificação dos fragmentos ovarianos.

Tabela 2. Viabilidade média de oogônias-tronco dos respectivos crioprotetores com diferentes molaridades após vitrificação de fragmentos ovarianos de *Brycon orbignyanus*.

SIGLAS E SÍMBOLOS

CEPTA – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental.

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

MMA - Ministério do Meio Ambiente

PAN - Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies da Fauna Aquática Ameaçadas de Extinção do Ecossistema Mogi/Pardo/Sapucaí-Mirim/Grande

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAS E MÉTODOS	12
3.1 Fracionamento dos ovários de <i>Brycon orbignyanus</i>	12
3.2 Dissociação celular enzimática dos ovários de <i>Brycon orbignyanus</i>	14
3.3 Avaliação do percentual de pureza e viabilidade de oogônias-tronco nas amostras.....	15
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	17
6. RECOMENDAÇÕES PARA MANEJO.....	19
7. AGRADECIMENTOS.....	20
8. CRONOGRAMA DE CONCLUSÃO DO PLANO DE TRABALHO.....	20
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

Os peixes correspondem ao maior grupo, dentre os vertebrados, em quantidade de variedade taxonômica descritas. Foram catalogadas até o momento mais de 36.380 espécies, considerando mais de 18.420 pertencentes ao habitat de água doce (FRICKE; ESCHMEYER; VAN-DER-LAAN, 2022). A região neotropical apresenta uma das mais ricas faunas do mundo em termos de diversidade de espécies, incluindo os peixes, que exercem importantes funções ecológicas nos ecossistemas aquáticos. Até o momento foram descritas mais de 6.080 espécies de peixes nesta região (DAGOSTA; PINNA, 2019; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003), concentrando no Brasil mais de 3.130 espécies da subclasse Actinopterygii considerando 311 espécies ameaçadas de extinção de acordo com o Livro Vermelho da fauna Brasileira (ICMBIO/MMA, 2018). Devido há abundância e sua ampla diversidade, assumem um papel de grande importância socioeconômica e fonte de recursos nutricionais para a maioria das comunidades costeiras, sendo algumas espécies de grande potencial para a aquicultura (WINEMILLER et al., 2008). Esta atividade tem sido considerada com o maior crescimento contínuo no mundo, atingindo uma produção total de peixes de cultivo de 860.355 toneladas em 2022 e um aumento de 2,3% considerando o ano anterior (PEIXEBR, 2023).

Ações antrópicas em conjunto com o crescimento demográfico, tem colocado em risco a ictiofauna causando grande impacto ambiental devido a exploração dos recursos naturais, tais como aumento do desmatamento das matas ciliares, crescimento de cidades e do setor industrial que aumentam a quantidade de poluentes produzidos podendo alterar de forma nociva, vários processos fisiológicos envolvidos na reprodução dos peixes, levando potencialmente a perdas populacionais de algumas espécies (TOLUSSI, 2018). Se destacando a construção de barragens (interrupção dos cursos naturais dos rios) para produção de energia, sendo o principal fator que afeta a abundância de peixes migratórios e a fragmentação dos habitats (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005), introdução de espécies exóticas e sobrepesca, que juntos provocam a desestruturação dos ecossistemas aquáticos ou até mesmo a extinção local de algumas espécies. (MARINHO et al., 2006). A intensificação dessas condições tem colaborado para o aumento do número de espécies de teleósteos no Livro Vermelho de Espécies Ameaçadas de

Extinção, encontrados atualmente, 52 espécies da ordem Characiformes e 91 espécies de Siluriformes (ICMBIO/MMA, 2018).

Devido ao grande número de espécies que se encontram em perigo de extinção, tem-se despertado o interesse para realização de estudos sobre a conservação da ictiofauna (SIQUEIRA-SILVA et al., 2018). O Brasil possui um grande potencial hídrico, sendo privilegiado pelas muitas espécies de peixes ainda pouco exploradas e com potencial zootécnico não conhecido (LUZ et al., 2001). Dessa forma, o desenvolvimento de biotecnologias pode auxiliar na reconstituição de espécies ameaçadas e colaborar efetivamente na conservação dos diferentes grupos de peixes que assumem importâncias ecológicas únicas.

Diferentes métodos para geração de bancos genéticos *ex situ* de peixes já foram desenvolvidos, como no caso da criopreservação de sêmen (MARIA & CARNEIRO, 2012). Embora essa técnica tenha sido aplicada com sucesso em espermatozoides de muitas espécies, faltam métodos confiáveis para uma preservação a longo prazo de oócitos e embriões (YOSHIZAKI et al., 2005)

O método mais indicado para preservar os recursos genéticos dos peixes, é por meio da utilização das células germinativas primordiais (PGCs) e células germinativas-tronco (espermatogônias e oogônias). Uma vez que, PGCs surgem nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário e migram em direção a crista genital podendo se diferenciar em gametas de ambas os sexos (GOTO-KAZETO et al., 2010). Enquanto que células germinativas-tronco correspondem a linhagem que através da diferenciação e divisão celular meiótica, formara espermatozoides e ovócitos maduros (XIE, NÓBREGA & PŠENIČKA, 2020). Estas células são responsáveis por transmitir informações genéticas para as gerações futuras, garantindo a propagação das espécies além de possuir alta plasticidade sexual,

A criopreservação de células germinativas-tronco visa aumentar sua longevidade por vários anos sem nenhuma alteração drástica na capacidade de fertilização dos gametas, diminuindo drasticamente a temperatura e, conseqüentemente, reduzindo sua taxa metabólica (DIWAN et al., 2010). Além disso, os procedimentos de criopreservação apresentam benefícios importantes, visto que, os protocolos de criopreservação estão sendo desenvolvidos com viabilidade satisfatória, garantindo uma boa perspectiva para a produção de uma quimera da linhagem germinativa por meio da transferência de células

germinativas de uma espécie-alvo para um hospedeiro apropriado, visando à produção de gametas heterólogos e seguinte transplante de células germinativa (OKUTSU et al., 2006; SAITO et al., 2008; LACERDA et al., 2010; NÓBREGA et al., 2010; HIGAKI et al., 2018; BETSY; KUMAR, 2020).

Dessa forma, o desenvolvimento de biotecnologias com enfoque na criopreservação e posterior transplante de células germinativas-tronco, se tornam uma importante ferramenta para geração de bancos genéticos que contribuem em ações de conservação das espécies de peixes ameaçados de extinção e garantindo a prosperidade ecológica do ecossistema aquático.

2. OBJETIVOS

Este projeto tem como **objetivo geral** avaliar o efeito de crioprotetores no processo de criopreservação de oogônias-tronco da espécie *Brycon orbignyanus* visando a produção de quimeras germinativas.

Dentro os **objetivos específicos**, pretendemos estabelecer protocolos de criopreservação de oogônias-tronco de *Brycon orbignyanus*, avaliando diferentes crioprotetores em diferentes concentrações molares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram coletados dos viveiros do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA/ICMBio, em Pirassununga – SP. Os animais atualmente são mantidos em aquários, como objeto de pesquisas em andamento (Acordo de Cooperação Técnica 02031.000135/2019-51). O projeto é fomentado pela Fundação do Instituto de Biociências – UNESP Campus Botucatu, objeto do Acordo de Cooperação Técnica Unesp/ICMBio (02031.000135/2019-51) e intitulado “*Tecnologias reprodutivas e mecanismos de determinação sexual em Piracanjuba*”. O projeto mencionado teve o acompanhamento da Doutoranda Gabriella Braga Carvalho, a qual é pesquisadora voluntária do ICMBio e atua no âmbito do referido Acordo de Cooperação Técnica, no Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA/ICMBio.

3.1 Fracionamento das gônadas de *Brycon orbignyianus*

Para esse experimento, foi utilizado quatro fêmeas de *Brycon orbignyianus*, com média de 0,470 kg de peso corporal e 30 cm de comprimento padrão, sendo coletada nos viveiros do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA/ICMBio, em Pirassununga-SP e eutanasiada em solução de eugenol na concentração de 200 mg/L (Biodinâmica, Brasil).

Inicialmente, as gônadas foram retiradas e divididas em 9 fragmentos, utilizando lâmina de bisturi, com corte vertical e em seguida horizontal (Figura 1). Posteriormente, foram acondicionadas em placa de Petri contendo solução de Hank’s modificado.

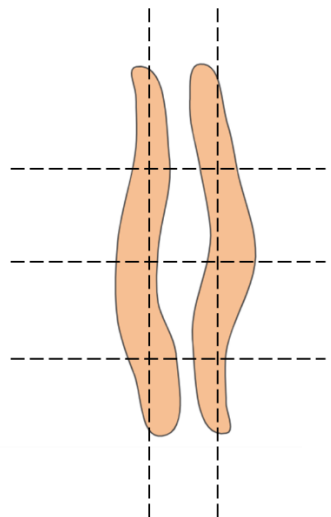


Figura 1 - Ilustração de como foi realizado o fracionamento das gônadas. Inicialmente com corte vertical e em seguida, horizontal.

Em seguida, cada fragmento foi pesado e imerso em solução crioprotetora por 10 minutos. As soluções crioprotetoras, os controles e os respectivos pesos dos fragmentos de gônada estão apresentados na tabela 1. As soluções foram preparadas com Hank's contendo 100 Mm de glicose e 0,1% de soro albumina bovina. Para o grupo controle foi utilizado apenas a solução de Hank's modificado.

Tabela 1 – Soluções crioprotetoras utilizadas para vitrificação de gônadas fragmentadas.

Molaridade	Crioprotetor	Peso do Fragmento (g)
Controle antes da vitrificação		0,1008
3M	DMSO	0,0896
4M		0,0832
5M		0,1213
3M	Propanodiol	0,0922
4M		0,0880
5M		0,1014
Controle após vitrificação		0,0952

Após 10 minutos de exposição aos crioprotetores, os fragmentos foram sobrepostos em tecido de malha fina e com auxílio de uma pinça, foram mergulhados imediatamente em nitrogênio líquido em temperatura de -196°C e transferidos para

criotubos (Corning Incorporated Sigma, St. Louis, USA). Posteriormente, as amostras foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido e armazenadas (Figura 2).

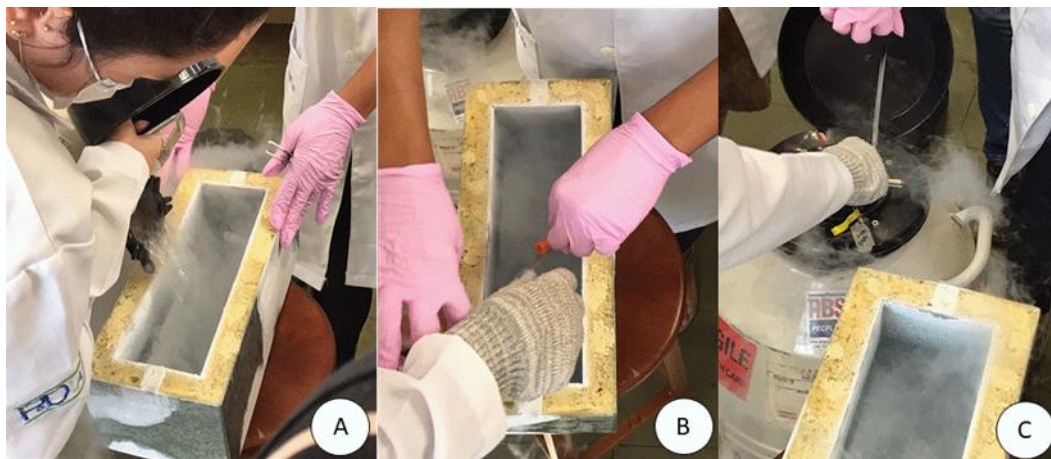


Figura 2 - Principais etapas da vitrificação. A) Transferência do nitrogênio líquido para caixa térmica de inox, B) Fragmentos mergulhados em nitrogênio líquido e transferidos para criotubos e C) Armazenamento em botijão de nitrogênio.

3.2 Dissociação celular enzimática das gônadas de *Brycon orbignyanus*

Os fragmentos de DMSO e Propanodiol a 3, 4 e 5M, foram descongelados em banho maria à 30°C por 1 minuto e em seguida foram triturados em cabine de fluxo laminar horizontal (FUH12, VECO, Brasil) utilizando lâminas de bisturi (Figura 2) e lavadas repetidas vezes em solução de Hanks modificada, para retirada de excesso de células sanguíneas. Posteriormente, os tecidos ovarianos foram transferidos individualmente para tubos de centrifuga de 15 mL, contando 10mL de solução de Hanks modificada e 0,02 mg/mL de colagenase tipo I (*Clostridium histolyticum* Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), na proporção de 100 mg de tecido ovariano/mL de solução.

A dissociação celular enzimática foi realizada a temperatura ambiente por 2 horas, em um homogeneizador (Agitador PROENIX, São Paulo, Brasil). Após este período, foi adicionado 20 µg/mL de DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) às amostras, e incubadas por mais 1h no homogeneizador.

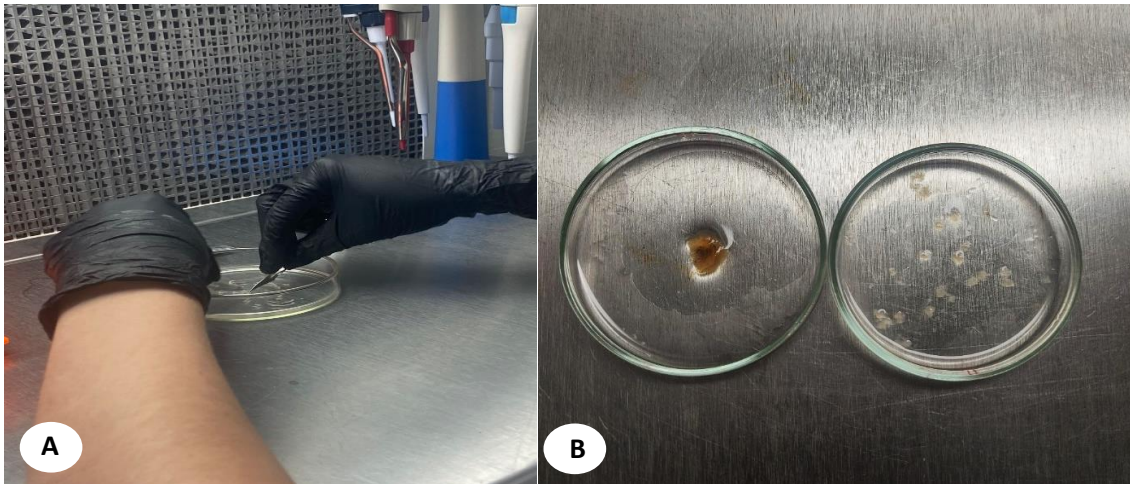


Figura 3 – Trituração do tecido ovariano fragmentado de *B. orbignyana*. A) trituração utilizando duas lâminas de bisturi em movimentos contrários e B) a esquerda fragmento recém descongelado e a direita após trituração do tecido ovariano

Após o procedimento de dissociação celular enzimática do tecido gonadal, o material foi duplamente filtrado, inicialmente utilizando uma malha de Nylon de 150 μm e posteriormente, outra de 50 μm , eliminando todos os resíduos de tecidos que não foram degradados. A suspensão celular obtida foi transferida para tubo de centrifuga de 15 mL e adicionada solução de Hanks modificada, até completar 14 mL. As amostras foram então submetidas a centrifugação a 300 x g durante 15 minutos (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 25°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspenso em 100 μL de solução de Hanks modificada.

3.3 Avaliação do percentual de pureza e viabilidade de oogônias-tronco nas amostras

Para o fracionamento das células germinativas e somáticas, utilizou-se a metodologia de gradiente de densidade de Percoll® Plus (Sigma-Aldrich # SLBH8181V, St. Louis, EUA), sendo as soluções distribuídas ao longo de um tubo de 15 mL, seguindo uma sequência de quatro gradientes de percoll 40%, 30%, 20% e 10%, adicionadas do fundo para a superfície, respectivamente. Com essa disposição, a suspensão celular foi depositada cuidadosamente na superfície da solução de 10% de Percoll e centrifugado a 800 x g, por 30 minutos a 28°C. Devido à diferença de densidade do Percoll e a diferença de densidade celular, as células tendem a ser separadas na transição entre os gradientes, formando um aglomerado celular visível (“banda”). Essa banda foi coletada,

ressuspensa em soluçã de Hanks modificada e centrifugadas a 300 x g por 8 minutos a 28°C, para retirar todo resíduo de Percoll.

Após a retirada do Percoll, a suspensão celular foi novamente centrifugada (300 x g por 8 min a 28°C) e ressuspensa em 1 mL de soluçã de Hanks modificada. Em seguida, quantificou-se a concentraçã celular total e também a de oogônias-tronco através da câmara de Neubauer, utilizando microscopia óptica (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) no aumento de 40X. A partir destes dados foi possível acessar a porcentagem de pureza das amostras de oogônias-tronco, vindas do fracionamento no gradiente de percoll. Após avaliar a pureza das células tronco, a viabilidade foi verificada utilizando azul de tripan a 0.4% (Gibco, Grand Island, USA), o qual penetra em células inviáveis corando-as em azul, permitindo, desta forma, a visualizaçã das células injuriadas. As contagens amostrais foram realizadas em triplicata.

4. RESULTADOS

A relevância dos crioprotetores para garantir a integridade celular durante o período de vitrificaçã e tornar oogônias-tronco viáveis após descongelamento, foi comprovado ao se analisar o grupo controle, sem utilizaçã de nenhum dos crioprotetores, que resultou na morte de todas as células congeladas, enquanto que as demais amostras de fragmentos do tecido gonadal, submetidos a aplicaçã dos crioprotetores em análise, apresentaram bons resultados de viabilidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Viabilidade média de oogônias-tronco dos respectivos crioprotetores com diferentes molaridades após vitrificaçã de fragmentos gonodais de *Brycon orbignyanus* oriundas do gradiente de percoll.

Fragmentos	Crioprotetor	Células Vivas %		Células Mortas %	
Controle					
Após Vitrificação					
		100,00	± 13,00	0,00	± 0,00
3M	DMSO	83,79	± 4,24	16,21	± 1,61
4M		87,90	± 4,97	12,10	± 0,89
5M		74,05	± 3,44	25,95	± 1,51
3M	Propanodiol	96,68	± 18,54	3,32	± 1,44
4M		85,29	± 18,11	14,71	± 0,38
5M		90,00	± 9,58	10,00	± 1,51
Controle					
Após Vitrificação					
		0,00	± 0,00	0,00	± 0,00

Os resultados observados das oogônias-tronco criopreservadas após vitrificação indicam que, o crioprotetor propanodiol a 3 M, apresenta maior média de porcentagem de viabilidade após descongelamento (96,68%) acompanhado de menor porcentagem de células mortais, o que o torna preferencial na utilização de possíveis transplante de células germinativas tronco de *Brycon orbignyanus*. Além disso, o mesmo crioprotetor a 5 M, destaca-se com o segundo melhor resultado com diferença de 6,68% na viabilidade de oogônias-tronco em comparação com o de menor molaridade.

Na tabela 2, é possível notar que o crioprotetor DMSO a 5 M contempla menor média de porcentagem de viabilidade (74,05%), entretanto os resultados obtidos através do crioprotetor propanodiol 5 M indicam maior média de porcentagem (90%) na viabilidade de células germinativas-tronco.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em peixes, a criopreservação de sêmen já foi descrita para muitas espécies, no entanto, existem dificuldade em consolidar protocolos de criopreservação para células

germinativas-tronco e embriões. A criopreservação de gametas é considerada difícil usando métodos de congelamento lento ou refrigeração rápida devido ao seu tamanho, baixa permeabilidade à membrana do crioprotetor e sua alta sensibilidade ao passar pelo resfriamento e descongelamento (HIGAKI et al., 2010). O processo de criopreservar o material biológico germinativo é de extrema necessidade para a realização de transplantes de células germinativas-tronco em receptores e assim, prosperar a geração de quimeras germinativas, uma vez que, esse procedimento ocorre durante o período reprodutivo, entre o final e ao início do próximo ano para muitas espécies, através de receptores estéreis durante o estágio larval. Entretanto, a obtenção das células germinativas da espécie doadora ocorre durante o período de crescimento primário, no início da oogênese, momento em que oogônias-tronco se concentram em maior número e não sofreram seu processo de maturação, ocorrendo geralmente entre maio a julho em muitas espécies. Sendo assim, o investimento em armazenamento a longo prazo de células-tronco de linhagem germinativa utilizando a criopreservação é válido quando se almeja conservar e gerar bancos genéticos de espécies ameaçadas de extinção.

Em outros estudos, o crioprotetor DMSO vem sendo utilizado como universal para preservar gametas e embriões, obtendo sucesso na criopreservação de espermatogônias de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando o método de congelamento (LACERDA et al., 2010). Da mesma forma, através do método de vitrificação, DMSO a 5 M, foi eficaz para criopreservar oogônias de ciprinídeo honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*) obtendo viabilidade de 75% após descongelamento (HIGAKI et al., 2018). Nossos resultados, indicam valores similares no desempenho do crioprotetor DMSO a 5 M, porém na concentração de 4 M obtivemos melhores resultados quanto a viabilidade (87,90%) após o descongelamento.

O processo de criopreservação de células germinativas tronco é comumente utilizado através de dois métodos, a metodologia de congelamento lento sendo utilizado a rampa de resfriamento de $-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, em freezer a -80°C (FRANĚK et al., 2019; LEE & YOSHIZAKI, 2016; PŠENIČKA et al., 2016), ou utilizaram o método de vitrificação (SEKI et al., 2017). Independente do método utilizado, o procedimento baseia-se em etapas fundamentais, a começar pela exposição ao crioprotetor, permitindo difusão nos compartimentos celulares do material, em seguida o resfriamento com redução da temperatura de forma gradual (congelamento lento) ou súbita (vitrificação), na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica possibilitando o

armazenamento e preservação do material em temperatura ultrabaixa por períodos indefinidos e possibilitando o descongelamento ou aquecimento, quando desejado, para resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular (CASTRO et al., 2011). Em nosso estudo utilizamos o método de vitrificação, e para essa metodologia, faz-se necessário a aplicação de altas concentrações dos crioprotetores propanodiol e DMSO, obtendo assim uma solução com elevada viscosidade (HIGAKI et al., 2018). Com tudo, é possível considerar que a eficiência desses crioprotetores variam muito em função da estrutura da célula ou tecido a ser criopreservado além do seu tempo de exposição (FULLER & PAYNTER, 2004).

A submissão dos fragmentos gonadal de *Brycon orbignyianus* aos dois crioprotetores em diferentes concentrações e alterações na molaridade, apresentaram resultados promissores. A porcentagem de viabilidade celular utilizando o propanodiol a 3 M apresentou alta eficiência na preservação de células germinativas tronco após descongelamento. Com o intuito do transplante, esta solução é a mais adepta para preservar os recursos genéticos e gerar a criação de criobancos capazes de preservar células germinativas tronco e serem utilizadas na garantia da conservação de espécies sendo uma ferramenta crucial para o combate a extinção total de espécies ameaçadas.

6. RECOMENDAÇÃO PARA MANEJO

Brycon orbignyianus representa uma das espécies dentre outras sete pertencentes ao gênero *Brycon* na lista de espécies ameaçadas de extinção na categoria de risco “Em Perigo” (EN) segundo a classificação do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção – ICMBio/2018. Como consequente, a espécie em estudo, é listada como espécie-alvo do Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies da Fauna Aquática Ameaçadas de Extinção do Ecossistema Mogi/Pardo/Sapucaí-Mirim/Grande - PAN Mogi/Pardo/Sapucaí-Mirim/Grande portanto, necessitam com urgência a mobilização de ações de conservação, programas de repovoamento e reprodução além da

criação de bancos genéticos *ex situ* para garantir preservação e perpetuação da população da espécie.

Em vista disso, é de suma importância a continuidade dos estudos técnicos e científicos que vem sendo desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA, com enfoque no desenvolvimento de estudos reprodutivos em ambiente natural e em cativeiro. Os resultados apresentados através do projeto, visam a estocagem de células germinativas assim como sua criopreservação para garantir o futuro genético da espécie *Brycon orbignyanus* e o melhoramento no manejo desse grupo, servindo como ferramenta que possibilita a garantia para fins de conservação.

7. AGRADECIMENTOS

Agradeço o orientador Me. Cláudio Cazal de Araújo Lira Filho (Analista Ambiental do ICMBio/CEPTA); à coorientadora Doutoranda Gabriella Braga Carvalho; e a toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia do CEPTA, pelo apoio, disponibilidade, competência e paciência em compartilhar seus conhecimentos. A todos os funcionários do ICMBio/CEPTA, em Pirassununga, pelo acolhimento e gentileza. Ao CNPq, ICMBio/CEPTA pela oportunidade de ingresso a iniciação científica através do PIBIC/ICMBio e a todo incentivo e suporte para o desenvolvimento da pesquisa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M. & GOMES, L. C. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 646-652, 2005.
- BETSY, J., & KUMAR, S. Cryopreservation of Fish Gametes. **Singapore: Springer**, 2020.
- BORELLA, M. I.; CHEHADE, C.; COSTA, F. G.; JESUS, L. W. O.; CASSEL, M. & BATLOUNI, S. R. The brain-pituitary-gonad axis and the gametogenesis. **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**, p. 315-341, 2020.
- CASTRO, S. V., CARVALHO, A. D. A. & ROCHA, L. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.
- CLOUD, J. G.; MILLER, W. H. & LEVANDUSKI, M. J. Cryopreservation of Sperm as a Means to Store Salmonid Germ Plasm and to Transfer Genes from Wild Fish to Hatchery Populations. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 52, n.1, p. 37-41, 1990.
- DAGOSTA, F. C. P. & DE PENNA, M. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 431, p. 1-163, 2019.
- DIWAN, A. D.; AYYAPPAN, S. LAL, K. K. & LAKRA, W. S. Cryopreservation of fish gametes and embryos. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 80, n. 4, p. 109-124, 2010.
- FULLER, B. & PAYNTER, S. Review Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine**, v.9, n.2, p.680-691, 2004.
- FRANĚK, R., TICHOPÁD, T., STEINBACH, C., XIE, X., LUJIĆ, J., MARINOVIĆ, Z., HORVÁTH, A., KAŠPAR, V., & PŠENIČKA, M. Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. **Cryobiology**, v.87, p.78-85, 2019.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W.; VAN-DER-LAAN, R. **ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES**. 2020. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/calalog/fishcatmain.asp>. Acesso em: 05 fev. 2023.
- HIGAKI, S.; ETO, Y.; KAWAKAMI, Y.; YAMAHA, E.; KAGAWA, N.; MASASHIGE, K.; NAGANO, M.; KATAGIRI, S. & TAKAHASHI Y. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. **Society for Reproduction and Fertility**, v.139, n.4, p.733-740, 2010.
- HIGAKI, S.; TODO, T.; TESHIMA, R.; TOOYAMA, I.; FUJIOKA, Y.; SAKAI, N. & TAKADA, T. Cryopreservation of male and female gonial cells by vitrification in the

critically endangered cyprinid honmoroko *Gnathopogon caerulescens*. **Fish Physiol Biochem**, v. 44, p. 503-513, 2018.

ICMBIO/MMA. Volume VI - Peixes. In: ICMBIO (Ed.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: p. 1-94, 2018.

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, n. 5, 2010.

LEE, S. & YOSHIZAKI, G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). **Cryobiology**, v.72, n.2, p.165-168, 2019.

LUZ, R. K.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; FERREIRA, A. A. & ZANIBONI-FILHO, E. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E ESTAGIOS LARVAIS DO MANDI-AMARELO *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n.1, p. 49-55, 2001.

MARINHO, R. S. A.; SOUZA, J. E. R. T.; SILVA, A. S. & RIBEIRO, L. L. Biodiversidade de peixes do semi-árido paraibano. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, n. 1, p. 112-121, 2006.

NAGAHAMA, Y. & YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth & Differentiation**, v.50, p.195-219, 2008.

NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R. & SCHULZ, R. W. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. **PloS ONE**, v.5, n.9, 2010.

OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y. & YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Pnas**, v. 103, n.8, p. 2725-2729, 2006.

PEIXEBR, Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2023** [s.l: s.n.].

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, n.2, p.119-122, 2016.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. & FERRARIS, J. C. J. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. **Edipucrs**, p. 174-181, 2003.

SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; ARAI, K. & YAMAHA, E. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation. **Biology of Reproduction**, v.78, n.1, p. 159-166, 2008.

SEKI, S.; KUSANO, 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**, v.7, n.1, p.1-11, 2017.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SALTO, T.; SANTOS-SILVA, A. P., COSTA, R. S. Biotechnology Applied to fish reproduction: tools for conservation, **Fish Physiol and Biochemistry**, p. 1-17, 2018.

STREIT JR, D. P.; GODOY, L. C.; RIBEIRO, R. P.; FORMARI, D. C.; DIGMAYER, M. & ZHANG, T. Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species. **Recent advances in cryopreservation**, London: Cap. 3, p. 45-58, 2014.

TOLUSSI, C. E.; GOMES, A. D.; KUMAR, A.; RIBEIRO, C. S.; LO NOSTRO, F. L.; BAIN, P. A.; SOUZA, G. B.; CUNÃ, R.; HONJI, R. M. & MOREIRA, R. G. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 147, p. 926-934, 2018.

WINEMILLER, K. O.; AGOSTINHO, A. A. & CARAMASCHI E. P. Fish Ecology in Tropical Streams. **Tropical Strem Ecology**, v. 5, p. 107-139, 2008.

YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, Y.; KOBAYASHI, T. & TABEUCHI, T. Primordial germ cell: a novel tool for fish bioengineering. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1-4, p. 453-457, 2003.

YOSHIZAKI, G.; TAGO, Y.; TAKEUCHI, Y.; SAWATARI, E.; KOBAYASHI, T. & TAKEUCHI, T. Green Fluorescent Protein Labeling of Primordial Germ Cells Using a Nontransgenic Method and Its Application for Germ Cell Transplantation in Salmonidae, **Biology of Reproduction**, v. 73, n.1, p. 88-93, 2005.