

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PRODUÇÃO DE ZEBRAFISH GINOGENÉTICO MITÓTICO E
MEIÓTICO: COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA PROLE**

Príncia Grejo Setti

São Carlos
2023

Príncia Grejo Setti

**PRODUÇÃO DE ZEBRAFISH GINOGENÉTICO MITÓTICO E
MEIÓTICO: COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA
PROLE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Carlos para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

São Carlos
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP (processo 2018/18910- 6) e ao CNPq (processo 425668/2018-5) por financiarem esse projeto.

Acima de tudo, agradeço a minha família. Meu irmão por ser a minha melhor referência científica, por me ajudar em cada passo dentro da universidade, mesmo não sabendo nada de biologia e por ser o melhor irmão e amigo que eu poderia ter. Minha irmã por me mostrar com ser uma mulher forte e capaz de conquistar tudo que quiser, a melhor referência de pacificidade e respeito, além de ser a melhor irmã e amiga que eu poderia ter. Minha mãe, por ser a melhor e me apoiar em todas as minhas decisões e saber cada palavra e gesto correto para me confortar nas horas difíceis. Minha avó, por toda ajuda e dedicação que me deu durante todos esses anos.

Meu pai, por me ensinar a lutar e me ensinar que podemos conquistar o mundo, mas sempre sem esquecer quem somos, de onde viemos e jamais deixar de ser humilde. Mesmo não estando mais aqui conosco, saiba que conseguiu formar os três filhos. Também meu cunhado, o francês mais brasileiro que posso conhecer, o meu muito obrigada. E claro, os dois pequenos que mal chegaram ao mundo, mas que já têm todo meu coração: Gabriel e Arthur.

Agradeço também a minha orientadora, Hirla, que me ensinou tudo que sei sobre ciência e resiliência, muito obrigada por me acolher e me ajudar em cada fase da minha vida acadêmica e por me ajudar a traçar meu caminho. Meu muito obrigada também ao professor Ricardo e ao LIA por todo apoio e conselho durante essa pesquisa.

Agradeço infinitamente ao meu grupinho mais inesperado e diversificado que a Biologia me deu. Vitão com estilo e característica únicos, Hiago e sua inteligência inigualável, Jacqueline e sua delicadeza, Israel e suas piadas e Isabela e suas ousadia. Muito obrigada por cada risada, cada choro e cada surto. Admiro muito cada um.

Agradeço a todos que ajudaram a concretizar este trabalho incluindo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA), ao Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e ao Laboratório de Citogenética de Peixes da Universidade Federal de São Carlos (LCP-UFSCAR).

Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que importa é o lado o qual decidimos agir. Isso é o que realmente somos.”

(HARRY POTTER E A ORDEM DA FÊNIX. Direção: David Yates. Reino Unido, Estados Unidos: Warner Bros, 2007. 1 DVD)

RESUMO

O desenvolvimento de animais endogâmicos, em função da homogeneidade genética, representa ferramenta importante para pesquisas biomédicas. Para gerar Zebrafish homozigoto, é possível interromper a conclusão da meiose II ou mitose em embriões haploides. Para realizar essas interferências no ciclo celular, existem diferentes metodologias baseadas no choque de pressão, com grau de complexidade e taxas de sucesso variáveis. Para simplificar e melhorar a taxa de sucesso, este trabalho propõe desenvolver e testar uma nova metodologia, com procedimentos mais simples, baseada na combinação de irradiação espermática por UV-C por um tempo mais curto seguido de um choque térmico em diferentes temperaturas. Deste modo, o desenvolvimento dos descendentes gerados por ginogênese meiótica (Mei) ou mitótica (Mit), por meio das combinações de diferentes parâmetros de irradiação (28,5 mJ/cm², 105 mJ/cm² e 210 mJ/cm²) e temperaturas (Mei: 40,40, 40,60 ou 40,90°C; Mt: 41,40, 41,90 ou 42,45°C), foi comparado. Para confirmar o sucesso da ginogênese, foi feita uma compilação de metodologias não moleculares, acrescentando o uso de contagens de metáfases embrionárias. Os resultados mostraram que a irradiação de 28,5mJ/cm² por curto período, garante embriões haploides e boa taxa de fertilização. Em relação à temperatura, o choque a 40,6°C aplicado dos 4 minutos aos 6 minutos pós fertilização, alcançou média de 42,08% de animais saudáveis ao final de 120 horas pós fertilização. Na ginogênese mitótica, 41,9°C apresentou média de 11,91% de larvas saudáveis em 120 horas pós fertilização quando aplicado o choque entre 18 a 20 minutos pós fertilização. Conclusão: a metodologia proposta foi eficaz em gerar embriões ginogenéticos sendo que ginogênese meiótica gerou descendentes com taxas de viabilidade, malformação e saúde maior do que a técnica mitótica. A retenção do segundo corpúsculo polar requer menor temperatura (~1,3°C) e está ligada ao estágio de desenvolvimento. Ao passo que, para interromper um ciclo mitótico, foi necessário utilizar temperatura mais alta.

Palavras-chave: ginogênese, homozigose, isogenia.

ABSTRACT

The development of inbred animals, due to genetic homogeneity, represents an important tool for biomedical research. To generate homozygous Zebrafish, it is possible to disrupt the completion of meiosis II or mitosis in haploid embryos. To carry out these interferences in the cell cycle, there are different methodologies based on pressure shock, with varying degrees of complexity and success rates. To simplify and improve the success rate, this work proposes to develop and test a new methodology, with simpler procedures, based on the combination of sperm irradiation by UV-C for a shorter time followed by a thermal shock at different temperatures. Thus, the development of descendants generated by meiotic (Mei) or mitotic (Mit) gynogenesis, through combinations of different irradiation parameters (28.5 mJ/cm², 105 mJ/cm² and 210 mJ/cm²) and temperatures (Mei: 40.40, 40.60 or 40.90°C; Mt: 41.40, 41.90 or 42.45°C), was compared. To confirm the success of gynogenesis, a compilation of non-molecular methodologies was made, adding the use of embryonic metaphase counts. The results showed that the irradiation of 28.5mJ/cm² for a short period guarantees haploid embryos and good fertilization rate. Regarding temperature, the shock at 40.6°C applied from 4 minutes to 6 minutes post fertilization reached an average of 42.08% of healthy animals at the end of 120 hours post fertilization. In mitotic gynogenesis, 41.9°C showed an average of 11.91% of healthy larvae in 120 hours post fertilization when the shock was applied between 18 and 20minutes post fertilization. Conclusion: the proposed methodology was effective in generating gynogenetic embryos and meiotic gynogenesis generated offspring with higher viability, malformation and health rates than the mitotic technique. Retention of the second polar body requires lower temperature (~1.3°C) and is linked to the developmental stage. Whereas, to interrupt a mitotic cycle, it was necessary to use a higher temperature.

Keywords: gynogenesis, homozygosity, isogenie.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Foto da câmara de irradiação montada para a execução do projeto em questão. O modelo feito conta com agitador, duas lâmpadas UV-C de 15 Watts cada, além de alumínio ao redor de todas as laterais internas. (Autoria própria, 2019)20
- Figura 2:** Foto mostrando o sistema de choque térmico utilizado no projeto em questão. (Autoria própria, 2019).....25
- Figura 3:** Esquema da metodologia de ginogênese meiótica.26
- Figura 4:** Esquema da metodologia de ginogênese mitótica.27
- Figura 5:** Esquema da metodologia de ginogênese meiótica e mitótica.....29
- Figura 6:** Espermatozoides de Zebrafish em alta concentração vista sob um aumento de 1000 vezes. (Autoria própria, 2021)30
- Figura 7:** Diferentes estágios de desenvolvimento de Zebrafish. (à esquerda) Estágio de uma célula; (ao meio) embrião com 48 horas; (à direita) Larva com 96 horas, já apresentando completo desenvolvimento da retina e ouvido, ao passo que o saco vitelino está quase todo consumido (Autoria própria, 2021).31
- Figura 8:** Foto de microscopia óptica mostrando larva de 72 horas haploide resultante do ensaio de fertilização com espermatozoide irradiado com dose de 28,5 mJ/cm². (Autoria própria, 2021).32
- Figura 9:** Foto de microscopia óptica mostrando embrião após choque térmico 4mpf a 41,4°C: em 4 hpf houve bom desenvolvimento (à esquerda). Mas no período de 24 horas, houve morte em mais de 98% dos indivíduos (à direita). (Autoria própria, 2022).33
- Figura 10:**Foto de microscopia ótica, sob aumento de 1000 vezes, mostrando uma metáfase encontrada em controle haploide, com a metade de cromossomos da diploidia da espécie. (Autoria própria, 2022).33
- Figura 11:** Foto de microscopia óptica mostrando o padrão de pigmentação encontrada nos embriões em 48 hpf. O embrião esquerda é um representante do controle diploide que apresenta pigmentação celular ao longo do corpo e retina. Já o embrião à direita é um representante de ginogênese meiótica sob choque de 40.6°C aplicada dos 4 aos 6 minutos pós fertilização, ao passo que o segundo embrião é representante do controle diploide da mesma reprodução. A imagem evidencia a ausência de pigmentos celulares em tom preto tanto na retina, quanto ao longo do corpo no embrião ginogenético.(Autoria própria, 2022).34

Figura 12: Foto de microscopia óptica ilustrando embrião de controle haploide em 72 hpf. É possível analisar edema de pericárdio e saco vitelino, tamanho encurtado do corpo e elevado grau de lordose, além de tamanho diminuto dos olhos. (Autoria própria, 2022).	34
Figura 13: Fotografia de microscopia óptica ilustrando mutações decorrentes do choque térmico a 42,45°C aplicado em embriões haploides no período entre 18 e 20 mpf. Em 3 hpf (à esquerda) e 6 hpf (à direita). (Autoria própria, 2022).	35
Figura 14: Fotografia de microscopia mostrando os resultados analisados no experimento da aplicação de choque térmico em 41,9°C em embriões haploides para ginogênese mitótica em 0,75 hpf. O embrião à esquerda é de ginogênese mitótica com uma célula. O embrião à direita é de controle diploide com duas células. (Autoria própria, 2022).	36
Figura 15: Fotografia de microscopia óptica ilustrando representantes de cada tratamento em 24 hpf sendo controle diploide, controle haploide e ginogenético, respectivamente. Controle e ginogenético estão apresentados com desenvolvimento normal (imagens marginais) e controle haploide com cauda curta (imagem central). (Autoria própria, 2022).	36
Figura 16: Foto de microscopia óptica ilustrando controle haploide em 72 hpf. É possível analisar edema de pericárdio e saco vitelino, tamanho encurtado do corpo e elevado grau de lordose, além de tamanho diminuto dos olhos. (Autoria própria, 2022).	37
Figura 17: Foto de microscopia ótica, sob aumento de 1000 vezes, mostrando uma metáfase encontrada em controle haploide, com a metade de cromossomos da diploidia da espécie. (Autoria própria, 2022).	37
Figura 18: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento do embrião após 1 hora e 20 minutos da fertilização exibindo o número de células em cada grupo: C, H e Mei têm quatro células cada, enquanto Mit tem apenas duas células. (Autoria própria, 2022).	38
Figura 19: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento do embrião de 24 hpf. C, Mei e Mit tiveram desenvolvimento normal com formação de olhos e descolamento da cauda. H tinha cauda curta e malformação dos olhos. (Autoria própria. 2022).	38
Figura 20: Fotos microscópicas (objetiva de 100x) de embriões de 26 hpf com cromossomos metafásicos, com os grupos C, Mit e Mei contendo 50 cromossomos cada e o grupo H com 25. (Autoria própria. 2022).	39

Figura 21: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento de embrião de 48 hpf Grupos C, Mei e Mit com desenvolvimento normal e o grupo H com malformação (Síndrome Haploide). C tinha pigmentação caracterizada por olhos pretos e pontos pretos em todo o corpo, enquanto H, Mei e Mit não tinham pontos pretos no corpo e os olhos não eram pretos. (Autoria própria. 2022).40

Figura 22: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento larval de 72 hpf mostrando: Grupos C com desenvolvimento normal; grupos H com síndrome haploide caracterizada por corpo encurtado, tamanho reduzido dos olhos, edema do pericárdio e falha na circulação do tronco; duas amostras de larvas dos grupos Mei e Mit com desenvolvimento normal; e lordose, edema pericárdico, retardo de eclosão, respectivamente. (Autoria própria. 2022).41

Figura 23: Foto de microscopia mostrando o desenvolvimento larval de 120 hpf mostrando: Grupos C com desenvolvimento normal; duas amostras de larvas dos grupos Mit e Mei ((Mei A e Mit A) com anatomia normal e sem bexiga inflada, respectivamente. (Autoria própria. 2022).42

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Dosagens impostas sobre espermatozoides.	21
Tabela 2: Número amostral de cada reprodução em cada grupo.....	28
Tabela 3: Diferentes dosagens, médias e porcentagem.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Motilidade espermática frente a diferentes doses de UV-C- cronometragem (<i>Autoria própria, 2021</i>).	31
Gráfico 2: Gráficos exibindo os valores médios (desvio padrão) das taxas de sobrevivência, malformações e taxa de larvas saudáveis em 120 hpf. Os dados foram analisados usando o teste Anova de 1 via, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas com valor $p < 0,05$. (<i>Autoria própria. 2022</i>).	43

LISTA DE ABREVIATURAS

HPF- Horas pós fertilização

MPF- Minutos pós fertilização

UV-C- Radiação Ultravioleta do tipo C (254 nanômetros)

ÍNDICE

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELA	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
ÍNDICE	13
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. A importância do Zebrafish nas pesquisas	13
1.2. A importância do controle genético em animais de pesquisa	13
1.3. A técnica de ginogênese	14
1.4. Ginogênese mitótica	14
1.5. Ginogênese meiótica	15
1.6. Destruição do material genético espermático e ginogênese	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Da linhagem utilizada	18
3.2 Da manutenção da linhagem	18
3.3 Da padronização de fertilização <i>in vitro</i>	18
3.4 Da padronização de irradiação espermática	20
3.5 Da padronização de técnicas de análise do sucesso da ginogênese.	22
3.6 Da padronização de ginogênese meiótica	24
3.7 Da padronização de ginogênese mitótica	26
3.8 Da comparação entre ginogênese mitótica e meiótica quanto ao desenvolvimento da prole	28
4. RESULTADOS	30
4.1. Da padronização de fertilização <i>in vitro</i>	30
4.2. Da padronização de irradiação espermática	31
4.3. Da padronização de ginogênese meiótica	32
4.4. Da padronização de ginogênese mitótica	35
4.5. Da comparação entre ginogênese mitótica e meiótica quanto ao desenvolvimento da prole	38

5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância do Zebrafish nas pesquisas

O Zebrafish (*Danio rerio*, Cypriniformes, Cyprinidae) é atualmente o segundo modelo animal mais utilizado em pesquisas no mundo, atrás somente do modelo murino (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Devido a sua embriologia, há acesso imediato a todos os estágios de desenvolvimento, e, por isso, pode ser um modelo de vertebrado geneticamente manipulável em um nível anteriormente alcançado apenas com a *Drosophila melanogaster* (KIMMEL et al., 1995; LIESCHKE; CURRIE, 2007). A fertilização externa, alta fecundidade, rápido desenvolvimento e altas densidades demonstram como o Zebrafish é vantajoso e, portanto, capaz de refinar a qualidade dos resultados de pesquisa (KIMMEL et al., 1995; LIU et al., 2017).

1.2. A importância do controle genético em animais de pesquisa

A pesquisa atual necessita da utilização de animais que atendam a parâmetros de qualidade genética e sanitária a fim de garantir a viabilidade e confiabilidade dos resultados (ANDRADE, 2002). Nesse contexto, o uso de material biológico com genética uniforme e conhecida possibilita que as únicas variáveis sejam aquelas que o pesquisador introduz, o que diminui o número de animais usados e a necessidade de repetição do experimento (ANDRADE, 2002). Desta forma, a produção e uso de Zebrafish isogênicos, ou com alto grau de homozigose, possibilita o refinamento e a redução do uso de animais em pesquisas e representa compromisso com a aplicação princípio dos 3Rs (*reduce, replace, refine-*, em português, reduzir, substituir, refinar) nas pesquisas.

A propagação de uma linhagem *inbred* tem o propósito de minimizar a heterozigose geralmente por meio de endocruzamentos, fazendo com que todos os animais de uma linhagem sejam ligados a um ancestral comum por um intervalo mínimo de gerações (SANTOS, 2002). Em modelos murinos, a isogenia pode ser alcançada por meio de acasalamentos consanguíneos de 20 gerações, mas no modelo Zebrafish os acasalamentos consanguíneos foram alcançados até a 14ª geração (SHINYA; SAKAI, 2011).

1.3. A técnica de ginogênese

Uma técnica para alcançar altos graus de homozigose, em um período menor que o endocruzamento, é através da ginogênese. A ginogênese é um método de manipulação cromossômica caracterizado pelo uso exclusivamente de material genético feminino para produzir descendentes (EL-SAYED, 2019). Na técnica, o material genético do esperma é inativado por radiação UV-C ou raio gama e é usado exclusivamente para a ativação do óvulo feminino. O embrião potencialmente haploide sofre choque térmico ou choque de pressão para a diploidização do DNA. Nesta fase, ocorre ginogênese meiótica ou mitótica, dependendo de como o DNA é duplicado (ARAI, 2000; STREISINGER et al., 1981; WESTERFIELD, 2007). Essa técnica já foi aplicada a várias espécies de peixes de água doce e marinhas comercialmente importantes, incluindo o peixe dourado *Carassius auratus*, amago japonês *Oncorhynchus rhodurus*, medaka *Oryzias latipes*, loach da lagoa *Misgurnus anguillicaudatus*, tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, carpa comum *Cyprinus carpio*, e o robalo europeu marinho *Dicentrarchus labrax L.*, lampreia marinha *Petromyzon marinus* e grande corvina amarela *pseudociaena croce* (ARAI, 2001; BERTOTTO et al., 2005; CAI et al., 2010; KOBAYASHI et al., 1994; KOMEN et al., 1991; MÜLLER-BELECKE; HÖRSTGEN-SCHWARK, 2000; NARUSE et al., 1985; PANDIAN; KOTEESWARAN, 1998; PASCHOS et al., 2001; RINCHARD; DABROWSKI; GARCIA-ABIADO, 2006; SUWA; ARAI; SUZUKI, 1994).

1.4. Ginogênese mitótica

Dentre as possibilidades de diploidização de embriões haploides está a ginogênese mitótica, capaz de criar organismos totalmente homozigotos em primeira geração e linhagens isogênicas já na segunda geração se aplicada a mesma técnica na prole (ARAI, 2000; FRANĚK et al., 2020; STREISINGER et al., 1981).

Na literatura há estudos sobre a utilização desta técnica em Zebrafish utilizando 41,4 °C em 13 minutos após a fertilização como protocolo ou ainda 42 °C em 18 minutos após a fertilização (MENON; NAIR, 2019; MIZGIREV; REVSKOY, 2010). Para alcançar a ginogênese mitótica, um ciclo celular é interrompido por mecanismos que inibem a formação de fibras do fuso, o que significa que não há divisão das cromátides-irmãs (ARAI, 2000, 2001; STREISINGER et al., 1981). Assim, o zigoto torna-se diploide com 100% de homozigose para todos os loci. Embora seja uma

vantagem na conquista da isogenia, há poucos exemplares no mundo devido à baixa sobrevivência (ARAI, 2001).

1.5. Ginogênese meiótica

Na ginogênese meiótica, a conclusão da meiose II, que ocorre naturalmente após a fertilização pelo espermatozoide, é interrompida e o segundo corpúsculo polar é retido por meio de mecanismos físicos, como choque de pressão, capazes de desestabilizar e desorganizar os microtúbulos e centrossomos (KOMEN; THORGAARD, 2007). Uma vez retido, o material genético desse corpúsculo associa-se ao DNA primário e garante a diploidização do zigoto recém-formado (DAS; PATEL, 2020). Este método garante embriões homozigotos em loci que não sofreram recombinação durante a meiose I. Cerca de 50% de homozigose é detectada para loci centroméricos e menos de 1% para loci teloméricos (WALKER; WALSH; MOENS, 2009).

1.6. Destruição do material genético espermático e ginogênese

A utilização da técnica de inativação do material genético espermático acompanha o interesse acerca de genética na aquicultura, bem como a possibilidade de alcançar alta taxa de homozigose em peixes através da ginogênese (FISH, 1962).

A ginogênese surgiu em 1911, quando Hertwig analisou, em sapos, a não contribuição genética paterna no desenvolvimento de embriões quando espermatozoides de sapos receberam doses de raios gama (PURDOM, 1969). Hertwig analisou, ainda, que os embriões mostraram uma alta mortalidade em doses baixas de irradiação sobre os espermatozoides, mas apresentaram melhores taxas de sobrevivência em doses mais altas de irradiação. Tal fenômeno pode ser explicado a partir do princípio de que a inativação do espermatozoide é parcial em baixas doses com o resultado de que os embriões se desenvolvem com uma condição cromossômica aneuploidia, condição muito prejudicial ao desenvolvimento (NARUSE et al., 1985).

Desde então, muitos são os estudos utilizando a ginogênese e, por consequência, a inativação do material genético espermático. Thorgaard, em 1983, realizou um estudo acerca de manipulação de cromossomos e controle sexual em peixes, no qual citou as diversas possibilidades de inativação do material genético espermático tais como Raio X, Raio γ e Raio Ultravioleta, bem como suas vantagens e desvantagens (THORGAARD, 1983). Acerca da UV-C o autor cita sua facilidade e usabilidade em

laboratórios, bem como o menor perigo apresentado pela radiação ultravioleta ao ser humano. A autor ressalta que a luz ultravioleta danifica os cromossomos principalmente por indução de dímeros de timina, essa molécula não se encaixa bem na estrutura de dupla-hélice, bloqueando a replicação do DNA.

Por fim, (THORGAARD, 1983) analisa a ineficiência da destruição total do DNA espermático através da radiação ultravioleta quando se trata de amostras de esperma espesso e opaco. Para que a luz UV-C aja de maneira eficaz, é necessário a preparação de uma fina camada de material espermático que entrará em contato com a luz ultravioleta. A partir disso, o autor salienta a necessidade da adequação do método de destruição.

Em Zebrafish, (MENON; BHATTARAI; NAIR, 2017) utilizaram 30 s (6 mJ/cm²), 60 s (12 mJ/cm²), 90s (18 mJ/cm²), 120 s (24 mJ/cm²) e 150 s (30 mJ/cm²) para estudar os efeitos dessas doses sobre a inativação genética espermática e, por consequência, a prole resultante dessas irradiações. Os autores concluíram que em todas essas dosagens houve a inativação do material espermático, variando, entre os embriões, a gravidade da síndrome haploide, caracterizada por corpo encurtado, tamanho reduzido dos olhos, edema pericárdico e falha na circulação do tronco.

Baseado nos trabalhos da literatura, foram realizados os experimentos para obtenção de Zebrafish ginogenéticos meiótico ou mitóticos, no entanto, não foi possível com os choques térmicos propostos. Com isso, foi proposto neste trabalho avaliar a eficácia de outras temperaturas para duplicação do material genético materno.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparação de desenvolvimento da prole fruto de ginogênese mitótica e meiótica em questão de viabilidade, malformação e saúde.

2.2. Objetivos específicos

- I. Padronizar técnicas de fertilização *in vitro* no modelo Zebrafish sob as condições do laboratório sede;
- II. Padronizar a inativação do DNA espermática utilizando UV-C e mensurar a intensidade da irradiação necessária;
- III. Desenvolver técnicas para confirmação do sucesso do procedimento ginogenético;
- IV. Padronizar choque térmico para gerar embriões diploides a partir de embriões haploides recém fertilizados por meio de retenção do segundo corpúsculo polar;
- V. Padronizar choque térmico para gerar embriões diploides a partir de embriões haploides recém fertilizados por meio de interrupção de um ciclo mitótico;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Da linhagem utilizada

O projeto foi aprovado pela CEUA UFSCar sob os protocolos 6211040219 e 8222200722. A linhagem utilizada foi a estabelecida no laboratório de Imunologia Aplicada composta por machos de fenótipo selvagem e fêmeas de fenótipo dourado, sendo que a variedade dourada apresenta hipopigmentação de melanóforos na pele, bem como no epitélio pigmentar da retina (EPR) (LAMASON et al., 2005). Animais com tal fenótipo são homozigotos para a mutação dourada, sendo recessivos para o genótipo do tipo selvagem. Os animais utilizados eram proles, sem endocruzamento, geradas por pais já mantidos no laboratório, sendo assim, as condições de saúde e histórico de cada animal já era de conhecimento dos envolvidos nesse projeto.

3.2 Da manutenção da linhagem

Os animais utilizados tinham entre 6 e 12 meses de idade e foram mantidos em sistema de recirculação com pH 7, temperatura de 28 °C e salinidade de 1 g/L, sendo os parâmetros verificados e ajustados diariamente, com troca parcial de 25% da água todos os dias, sob ciclo claro/escuro de 14 horas/10 horas. Machos e fêmeas foram mantidos em aquários separados por pelo menos duas semanas antes dos experimentos, alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial adequada para a espécie (Min Flakes, Tetra, Alemanha) e uma quarta vez com artêmia liofilizada (FD Brine Shrimp, Tropical, Polônia). Foram removidas as fezes diariamente e os filtros limpos semanalmente. Todos os protocolos de cuidados e saúde dos animais foram seguidos conforme proposto por (WESTERFIELD, 2007).

3.3 Da padronização de fertilização *in vitro*

A primeira padronização realizada foi a fertilização *in vitro* utilizando o modelo animal. Para tanto, foi analisado: (i) otimização da coleta de espermatozoides e solução adequada para manter os espermatozoides vivos, porém inativos até o momento de fertilização, (ii) análise de motilidade espermática, (iii) extrusão de ovos, (iv) proporção de ovos e solução espermática, (v) proporção de gametas e meio para ativação.

Para a realização desta etapa, machos e fêmeas foram mantidos por 15 dias em aquários separados, quando então foram postos em um mesmo aquário com divisória perfurada e foram mantidos assim durante a noite que precedeu o experimento, seguindo a metodologia já estabelecida no laboratório, a fim de que houvesse liberação e circulação de ferormônios. A proporção utilizada entre macho e fêmeas foi de quatro machos para cada fêmea.

Na manhã do experimento, antes que se acendesse a luz, cada macho adulto foi posto em solução anestésica de triclaína (400 mg/L) (Sigma-aldrich, San Luis, Missouri, EUA) até que houvesse total paralização dos movimentos, quando então o animal foi posto sobre uma esponja macia com a parte ventral para cima. Em seguida foi seco com papel neutro e suave para então ser posto sob uma lupa e ter o esperma coletado através do uso de um microcapilar sem heparina. O material gamético coletado foi posto em solução de Ringer modificado (128,3 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 2,1 mM MgCl₂; 2,4 mM NaHCO₂) sobre gelo.

Isso feito, a motilidade espermática foi analisada por meio de microscópio óptico invertido (Primovert, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para tanto, 1 µL de solução espermática foi posta em uma lâmina de microscópio (26X76 mm) e observada sob um objetiva de 10 vezes, totalizando um aumento de 100 vezes. Uma vez confirmada a presença de espermatozoides foi aplicado 6 µL de meio embrionário para ativação.

Para a extrusão dos ovos, assim que a luz acendeu, cada fêmea foi anestesiada da mesma maneira que os machos, também foi seca delicadamente para então ser apertada para a liberação do material gamético, com a acomodação dos óvulos obtidos sobre um vidro de relógio. Logo em seguida, foi depositado sobre os ovos os espermatozoides coletados. Para isso, foi utilizado 6 µL de meio ringer a 28°C para cada 1 µL de solução espermática posta sobre os ovócitos femininos a fim da ativação dos gametas e, posteriormente, foi agitado o vidro de relógio delicadamente para auxiliar a fertilização. Passado um minuto, foi adicionado mais 1 mL de meio embrionário E3. Em seguida a placa foi depositada em uma estufa à 28°C e foi analisado o sucesso da padronização por meio do acompanhamento do desenvolvimento do embrião.

3.4 Da padronização de irradiação espermática

Para a realização da técnica de ginogênese, foi preciso padronizar a correta forma de irradiar os espermatozoides recém coletados de forma a manter a motilidade, mas com inativação do DNA. Foi optado pelo uso de luz ultravioleta-C, que apresenta comprimento de onda de 254 nm, muito utilizada para esterilização. Para esse projeto, foi construída uma cabine de irradiação espermática composta por duas lâmpadas germicida PHILIPS TUV8 15W (Holanda) junto a um agitador. Ao redor de todo o interior da caixa foi posto folha de alumínio para intensificar a irradiação (Figura 1). A distância entre amostra e as lâmpadas totalizou 32 cm. Para análise da potência em que a luz atinge a amostra, foi utilizado o Medidor de Energia e Energia Laser (RoHS) LabMax-TOP, COHERENT (Santa Clara, EUA) do Grupo de Ótica da Universidade de São Paulo, campus São Carlos.



Figura 1: Foto da câmara de irradiação montada para a execução do projeto em questão. O modelo feito conta com agitador, duas lâmpadas UV-C de 15 Watts cada, além de alumínio ao redor de todas as laterais internas. (Autoria própria, 2019)

Para medição, o sensor foi posto no centro do agitador contido na cabine de irradiação, simulando a amostra espermática para análise da potência atingida no local. Uma vez ascendidas as lâmpadas, o dispositivo foi deixado na cabine por, aproximadamente, 4 minutos para se obter uma amostragem precisa.

Sabendo que:

$$Dosagem = \frac{Energia}{\text{Área}} \quad (1)$$

E que:

$$Potência = \frac{Energia}{Tempo} \quad (2)$$

Logo:

$$Tempo = \frac{\text{Área} \cdot Dose}{Potência} \quad (3)$$

A partir das equações 1 a 3, foi possível realizar o cálculo para padronização de destruição de DNA espermático, sendo que a potência utilizada foi a média do valor máximo (0,33 mJ/s) e mínimo (0,23 mJ/s) registrado pelo sensor. Aqui vale ressaltar que a área que o sensor mediu equivale a área de 20 µL de líquido.

Feito isso, para comprimir um dos objetivos principais desse projeto, foi elaborado um ensaio para se analisar doses que são viáveis e inviáveis para os animais utilizados aqui. Para tanto, foi coletado o material gamético de 5 machos e, em seguida, foi analisado o material espermático (1 µL de suspensão espermática) em um microscópio óptico invertido (objetiva 10 x). Nesse momento, um cronometro foi iniciado, e só parou quando o último espermatozoide focado morreu. Esse resultado foi mantido com valor máximo de desempenho da amostra. Em seguida, cada amostra foi dividida em 3 partes (20 µL) e sofreram irradiação seguindo a Tabela 1, que foi elaborada segundo os cálculos sobre a dose por segundo (Área da amostra= 0,1962cm², com π=3,14):

$$t(s) = \frac{0,1962 (cm^2) \cdot dose \left(\frac{mJ}{cm^2}\right)}{0,28\left(\frac{mJ}{s}\right)}$$

Tabela 1: Dosagens impostas sobre espermatozoides.

Dosagem (mj/cm ²)	Tempo de exposição (s)
28.5	20
105	74
210	148

Foi escolhido (i) 28,5 mJ/cm² devido ao resultado encontrado por (MENON; BHATTARAI; NAIR, 2017) que, com dosagem próxima, obtiveram embriões com síndrome haploide entre média e intensa, caracterizada por edema de pericárdio, flexão acentuada da cauda, além do eixo do corpo encurtado. Em seguida foi testado (ii) 105mJ/cm², uma dosagem 3,7 vezes mais alta, para analisar como o esperma se

comporta em uma alta dosagem. Por fim, (iii) 210mJ/cm² foi utilizado por ser o dobro de (ii) e foi analisado se tal dosagem é letal para os espermatozoides. Em cada irradiação o resultado obtido foi verificado por microscopia igualmente realizado nos controles. A partir do tempo (s) de cada dosagem, foi calculada a média de cada uma.

Com base nesse achado, que será discutido na seção 4.2, foi preparado uma nova reprodução utilizando 28,5 mJ/cm² como dosagem de irradiação que teve como objetivo analisar a síndrome haploide na prole, além da taxa de fertilização. Para isso, o material gamético dos animais foi dividido em duas alíquotas (irradiado e não irradiado), e em seguida realizou-se fertilizações *in vitro* com ovos de 5 diferentes fêmeas e o desenvolvimento embrionário foi acompanhado a cada 24 horas durante 120 horas. Nesse primeiro período a única forma de confirmação de ploidia foi pela presença da síndrome haploide.

3.5 Da padronização de técnicas de análise do sucesso da ginogênese.

A confirmação do sucesso da inativação do material genético dos espermatozoides e o sucesso da ginogênese ocorreu compilando a metodologia proposta por (BAARS et al., 2016; MENON; NAIR, 2019; MIZGIREV; REVSKOY, 2010). Toda reprodução realizada nesse projeto contou com dois controles: um haploide, composto por embriões fertilizados por espermatozoides irradiados sem submissão ao choque térmico para diploidização e outro controle diploide, fertilizados por espermatozoides intactos. Todos os embriões foram do mesmo lote de espermatozoides e ovócitos.

Como formas de avaliação do sucesso de cada reprodução, foi analisada: (i) contagem cromossômica no controle N ou em todos tratamentos, a depender da reprodução; (ii) a síndrome haploide no controle N; (iii) análise fenotípica em 48 hpf nos controles e tratamentos; (iv) análise do atraso de divisão celular em ginogênese mitótica.

Para a contagem cromossômica foi utilizado um grupo de 10 embriões de 26 horas, seguindo, mas com adaptações, o protocolo estabelecido por (MENON; NAIR, 2019), descrito abaixo.

Análise Cromossômica:

Para análise cromossômica, os embriões tiveram o córions retirados manualmente usando um par de agulhas de insulina utilizando um microscópio invertido em objetiva de 4 vezes e, disso, foram transferidos para uma placa de vidro.

Foi removido o excesso de meio embrionário e adicionado 100 µL de meio embrionário contendo 4 mg/mL de colchicina (Sigma-aldrich, San Luis, Missouri, EUA). A placa foi incubada no escuro a 28 °C por 5 minutos. Em seguida, o meio foi substituído por outros 300 µL de meio embrionário fresco contendo 4 mg/mL de colchicina. A placa foi novamente incubada no escuro a 28 °C, agora por 90 minutos.

Passado esse período, foi descartado a colchicina e adicionado 400µL de meio embrionário por um minuto. Em seguida, os embriões junto ao meio foram transferidos para uma placa de Petri pequena e, em seguida, foi descartado o meio E3 e adicionado 1 mL de solução de citrato de sódio a 1,1% e iniciado a contagem. O saco vitelino de cada embrião foi perfurado usando um par de agulhas de insulina, e essa perfuração não excedeu 8 minutos. Ao final desses minutos, foi transferido a placa de Petri para uma bandeja plana de gelo e incubado por mais 8 minutos. Passado esse tempo, ainda em citrato de sódio, foi feita uma prefixação adicionando 10 gotas de fixador Carnoy 2 (3: 1 de metanol: ácido acético), feito uma suave ressuspensão e aguardado 10 minutos antes de retirar a solução e fazer a fixação final, no qual a solução e embriões foram transferidos para um tubo de centrifuga e adicionado 1mL de solução fixadora e incubados a 4 °C durante a noite.

No dia seguinte, lâmina de microscópio foi pré-aquecidas a 65 °C em uma placa aquecedora. Quanto à amostra, o excesso de fixador foi retirado com auxílio de pipeta. Em seguida, foi adicionado três gotas de solução de ácido acético a 50% aos embriões e então foram macerados com pistilo de encaixe perfeito no tudo de centrifuga. Mais uma gota de ácido acético a 50% foi derramada sobre o pistilo para lavá-lo.

Para estourar as células foi optado por utilizar o método de ressuspensão, no qual 20 µL da amostra foi posta e ressuspendida várias vezes utilizando uma pipeta automática na lâmina já aquecida, criando ondas de células.

As lâminas foram analisadas em microscópio ótico em uma objetiva de 100x, totalizando um aumento de 1000 vezes. As metáfases foram fotografadas utilizando microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão) acoplado com a câmera CoolSNAP e o programa Ikaros (Metasystems) e as fotos foram melhoradas pelo programa Photoshop (Adobe).

A presença de síndrome haploide no controle N foi avaliada nos embriões após 48 e 72 horas de fertilização e, como já descrito, as características dessa síndrome incluem encurtamento do corpo, edema de pericárdio e tamanho reduzido dos olhos.

A análise fenotípica foi caracterizada pela ausência de pigmento preto em todo o corpo bem como ausência de olhos pigmentados em 48 horas após a fertilização entre os embriões do controle haploide e embriões submetidos a choque térmico, metodologia que corrobora com (BAARS et al., 2016). Animais com fenótipo dourado são homozigotos para a mutação e recessivos para o genótipo do tipo selvagem. Assim, ao cruzar fêmeas douradas com machos selvagens puros (sem a presença do gene mutante), espera-se uma descendência cujo genótipo é heterozigoto, mas com fenótipo selvagem e, aplicando-se o princípio da ginogênese, os embriões devem ser portadores dessa mutação recessiva, bem como controle haploide, exibindo fenótipo dourado.

3.6 Da padronização de ginogênese meiótica

A literatura consultada nesse projeto utiliza o choque de pressão para alcançar ginogênese meiótica em Zebrafish e choque quente ou frio para outras espécies (FOPP-BAYAT; KOLMAN; WOZNICKI, 2007; GESTL et al., 1997; MANAN et al., 2022; MIMS et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2020; PERUZZI; CHATAIN, 2000). Nesse projeto foi optado pelo desenvolvimento de choque de temperatura em Zebrafish, uma vez que é mais simples, não requer equipamento especializado e é inédito na literatura nessa espécie. Dessa forma, o primeiro teste para padronização dessa metodologia foi a utilização de temperatura já descrita na literatura para uso em ginogênese mitótica em Zebrafish (41,4°C) (MIZGIREV; REVSKOY, 2010; STREISINGER et al., 1981; WESTERFIELD, 2007). Além dessa temperatura, outras três foram testadas 40,4 °C, 40,6 °C e 40,9 °C a partir dos resultados obtidos que serão bem relatados e discutidos na seção 4.3. Como método de banho quente, foi utilizado um sistema idealizado e executado pelo professor orientador desse trabalho e o termômetro utilizado como referência apresentou precisão de $\pm 0,5$ °C.

O sistema foi programado para alcançar e permanecer a temperatura mencionada e, em todos os experimentos, foi seguida a padronização de fertilização descrita na seção 3.3. Para irradiação, o material foi submetido à UV-C em alíquotas de 20 em 20 μ l, sob dosagem de 28,5 mJ/cm² e, ao final do processo, posta em um novo tubo de centrifuga, local em que foi adicionada todas as outras alíquotas também irradiadas para que houvesse uma homogeneidade nos resultados a serem obtidos. Do total, 25% de solução espermática foi reservada sem irradiação para a fertilização do controle diploide de cada experimento. O próximo passo foi a extrusão de ovos,

separando-os em três vidros de relógio (Controle Diploide, Controle Haploide e Tratamento- 4 mpf).

Os embriões haploides foram postos em uma peneira de malha suficientemente pequena para barrar os embriões e imersos em um Becker cheio de meio E3 na temperatura de 28°C. Aos 4 minutos após a fertilização, a peneira destinada ao tratamento foi submersa em banho-maria com controle PID de temperatura (Figura 2).



Figura 2: Foto mostrando o sistema de choque térmico utilizado no projeto em questão. (Autoria própria, 2019)

Um aerador foi constantemente mantido no fundo para agitar a água. Aos 6 minutos após a fertilização, os embriões foram removidos e retornados em meio a 28°C. A temperatura de tratamento apresentou variação de 0,01°C ao longo do procedimento, e a precisão do termômetro foi de $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

As quatro temperaturas testadas tiveram o mesmo rigor de experimentação e apenas a temperatura foi alterada em cada reprodução.

Os embriões foram postos em meio embrionário E3 em densidade de um embrião por mL, o meio foi trocado 50% todos os dias. A prole foi analisada diariamente até 120 hpf e as técnicas padronizadas para análise de sucesso do procedimento, incluindo contagem de cromossomos para controle haploide, gene mutante e síndrome haploide foram aplicados.

A figura 3 mostra esquematicamente como o procedimento ocorreu.

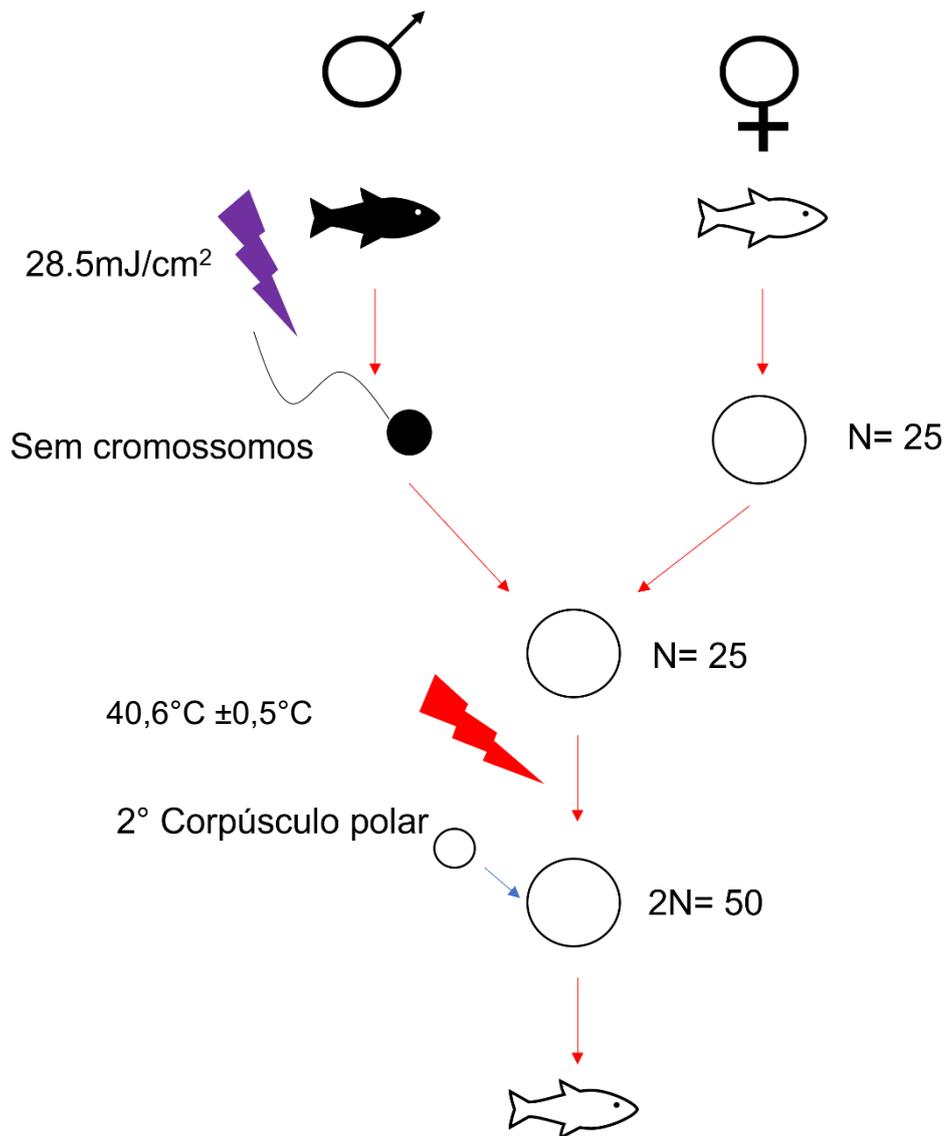


Figura 3: Esquema da metodologia de ginogênese meiótica.

3.7 Da padronização de ginogênese mitótica

A preparação dos animais, coleta de gametas, análise de motilidade espermática, irradiação dos gametas masculinos e fertilização seguiu a mesma metodologia já padronizada e exposta nas seções anteriores (3.3 e 3.4).

Para essa padronização, foram analisadas três temperaturas para verificação da viabilidade da amplitude térmica para choque mitótico: 41,4°C, 41,9°C, 42,45°C. Essas temperaturas rodeiam os valores já publicados de 41,4°C por (MIZGIREV; REVSKOY, 2010) e 42°C de (MENON; NAIR, 2019).

Para o choque foi utilizada a mesma metodologia padronizada para o choque meiótico descrito na seção 3.6, aplicando cada choque dos 18 aos 20 minutos pós fertilização. Da mesma forma, a temperatura de tratamento apresentou variação de $0,01^{\circ}\text{C}$ ao longo do procedimento, e a precisão do termômetro foi de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Os cuidados e técnicas de avaliação do sucesso do procedimento foram exatamente iguais aos descritos para a ginogênese meiótica.

A figura 4 mostra esquematicamente como foi delineado o procedimento.

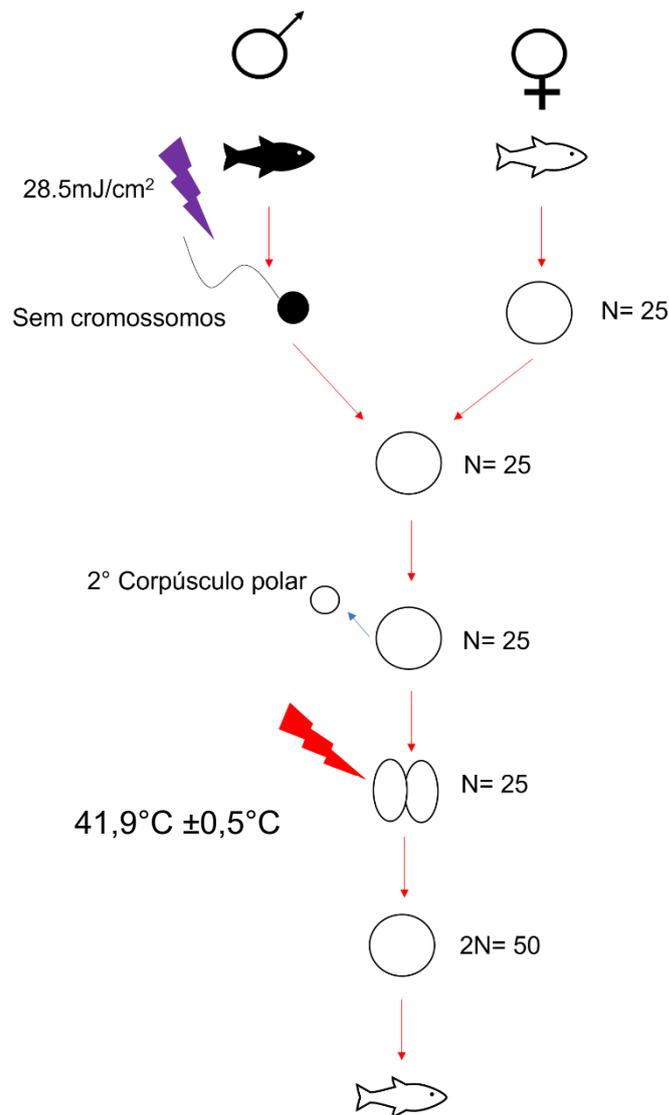


Figura 4: Esquema da metodologia de ginogênese mitótica.

3.8 Da comparação entre ginogênese mitótica e meiótica quanto ao desenvolvimento da prole

Uma vez padronizados os choques térmicos para ginogênese mitótica e meiótica e tendo sido analisado a viabilidade da execução de cada uma, foi possível aplicar a comparação entre ambas.

Para isso, uma só reprodução contou com controle diploide (C), controle haploide (H), ginogênese meiótica (Mei) e mitótica (Mit). Para a execução, a metodologia empregada foi a exposta nas seções 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7 já descritas. Do total, 10% dos ovócitos e pool espermático foi reservado para C, 10% para H e 40% para cada tratamento. A tabela 2 expõe o número amostral (ovos fertilizados) de cada grupo em cada reprodução utilizada.

Tabela 2: Número amostral de cada reprodução em cada grupo

Grupo	Reprodução	Número amostral
Haploide	1 ^o	21
Haploide	2 ^o	30
Haploide	3 ^o	26
Mitótico	1 ^o	102
Mitótico	2 ^o	125
Mitótico	3 ^o	158
Meiótico	1 ^o	156
Meiótico	2 ^o	150
Meiótico	3 ^o	143

Os embriões de ambos os tratamentos, bem como os controles, foram colocados em uma placa de Petri na densidade de um embrião para cada mililitro e mantidos a 28 °C em estufa controlada. O meio foi trocado em 50% todos os dias; mortalidade e o desenvolvimento embrionário foram contabilizados até 120 hpf.

No estágio de quatro células, o tratamento Mit foi comparado com outros para analisar o sucesso do procedimento.

Em 120 hpf, sobrevivida, malformações e larvas saudáveis foram analisados por meio de ANOVA 1 via e testes de Tukey, com $p < 0,05$ considerado significativo. A viabilidade foi considerada pela presença de vida e, malformações foram caracterizadas por ausência de bexiga natatória inflada, presença de edema pericárdico e do saco vitelino, lordose ou sinais da síndrome haploide. As larvas consideradas sadias foram aquelas que atingiram 120 hpf sem as malformações

citadas acima. Todos os cálculos foram realizados usando ovos fertilizados como referência.

A figura 5 ilustra esquematicamente como o experimento foi executado.

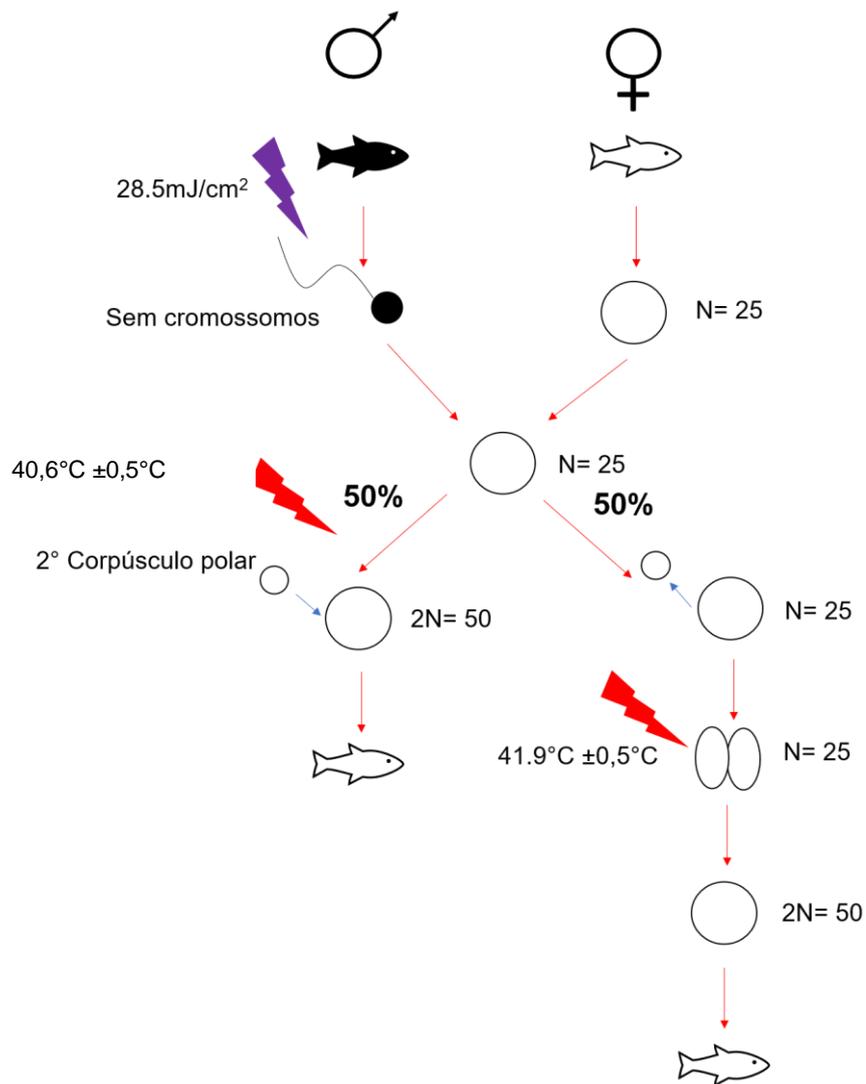


Figura 5: Esquema da metodologia de ginogênese meiótica e mitótica

4. RESULTADOS

4.1. Da padronização de fertilização *in vitro*

A padronização de todas as variáveis envolvidas em fertilização *in vitro* obteve bons resultados. A coleta de espermatozoides foi satisfatória utilizando microcapilar sem heparina, visto que, ao aproximá-lo do orifício urogenital de machos, a coleta espermática se deu por capilaridade, permitindo e maximizando a obtenção do material gamético. A utilização de Ringer modificado apresentou eficácia em manter os espermatozoides vivos, mas inativados sem perder a viabilidade deles por 1 hora. Portanto, a fertilização teve de ser feita logo em seguida da extrusão espermática.

Acerca da análise de motilidade espermática, a metodologia empregada foi eficiente no contexto e intuito aqui projetados, uma vez que foi possível analisar a concentração e avaliar se os gametas eram viáveis (Figura 6).



Figura 6: Espermatozoides de Zebrafish em alta concentração vista sob um aumento de 1000 vezes. (Autoria própria, 2021)

A partir da vista sob microscópio, foi possível aferir a proporção adequada de meio a ser posto para ativação dos gametas de modo que não houvesse sobreposição, pois diminui a eficácia da irradiação. Nesse contexto, quando houve baixa concentração espermática por peixe, foi coletado material gamético de mais de um peixe em 50uL, ao passo que quando houve alta concentração foi posto mais Ringer no tubo. Com isso, foi feito reproduções com sucesso e com taxas de fertilização acima de 85%, apresentando embriões com desenvolvimento normal em todas as fases de desenvolvimento até 120 hpf (Figura 7).

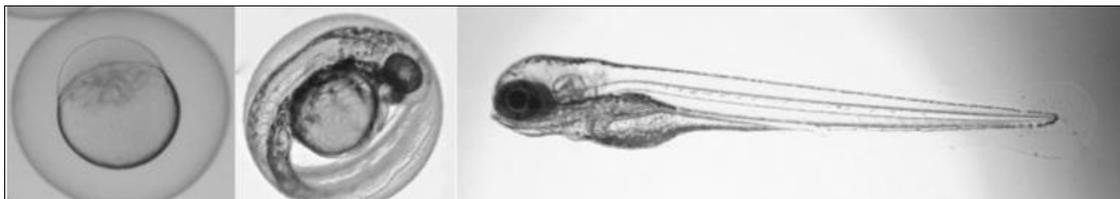


Figura 7: Diferentes estágios de desenvolvimento de Zebrafish. (à esquerda) Estágio de uma célula; (ao meio) embrião com 48 horas; (à direita) Larva com 96 horas, já apresentando completo desenvolvimento da retina e ouvido, ao passo que o saco vitelino está quase todo consumido (Autoria própria, 2021).

4.2. Da padronização de irradiação espermática

O gráfico 1 ilustra o resultado, em segundos, de cada dosagem, em cada macho utilizado.

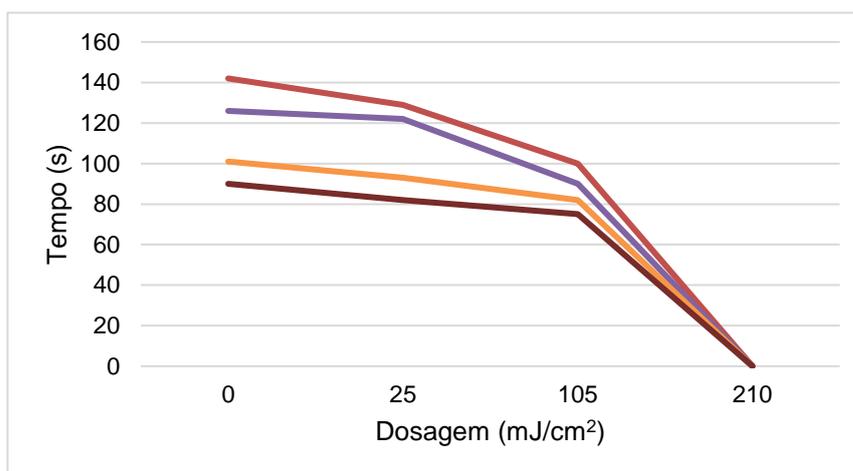


Gráfico 1: Motilidade espermática em cada macho sob as diferentes doses de UV-C- cronometragem (Autoria própria, 2021).

Já a tabela 3 mostra as médias de tempo de motilidade, em segundos, de cada dosagem.

Tabela 3: Diferentes dosagens, médias e porcentagem.

Dosagem (mJ/cm ²)	Média do tempo (s)	Porcentagem frente ao controle (%)
0	125,2	100
28,5	114	91
105	93,8	74,9
210	0	0

Uma vez analisada a viabilidade do uso de 25 mJ/cm^2 , quanto ao tempo de motilidade, a fertilização utilizando espermatozoides irradiados a essa dosagem mostrou que, enquanto, os embriões fertilizados com esperma normal apresentaram 100% de sobrevivência e eclosão até 72 hpf, espermatozoides irradiados produziram 100% de embriões com síndrome haploide severa (Figura 8). Esse resultado mostra a eficácia da dosagem que conta com vantagem frente a 105 mJ/cm^2 , uma vez que mantém os gametas vivos por mais tempo.

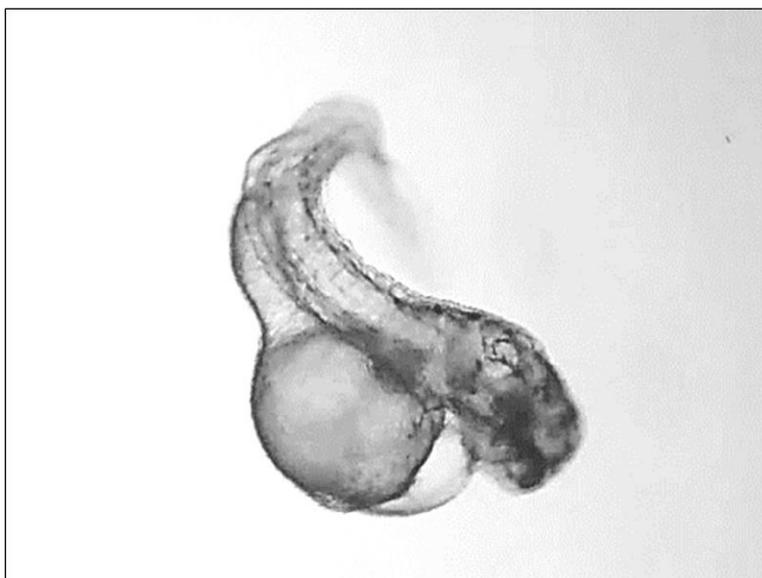


Figura 8: Foto de microscopia óptica mostrando larva de 72 horas haploide resultante do ensaio de fertilização com espermatozoide irradiado com dose de $28,5 \text{ mJ/cm}^2$. (Autoria própria, 2021).

Portanto, foi escolhido $28,5 \text{ mJ/cm}^2$ como padrão para esse projeto. A dosagem foi capaz de produzir uma prole haploide, ao mesmo tempo que não houve mais de 10% de perda de motilidade dos espermatozoides a ela submetidos.

4.3. Da padronização de ginogênese meiótica

Com o objetivo de gerar diploides meióticos, a utilização de choque térmico a $41,4^\circ\text{C}$, em embriões fertilizados há 4 minutos, não apresentou bons resultados. A taxa de fertilização foi superior a 85% e, em 6 hpf, foi visto o bom desenvolvimento dos embriões, como mostra a Figura 9. Todavia, em 24 hpf, mais de 98% dos embriões submetidos ao choque térmico morreram.

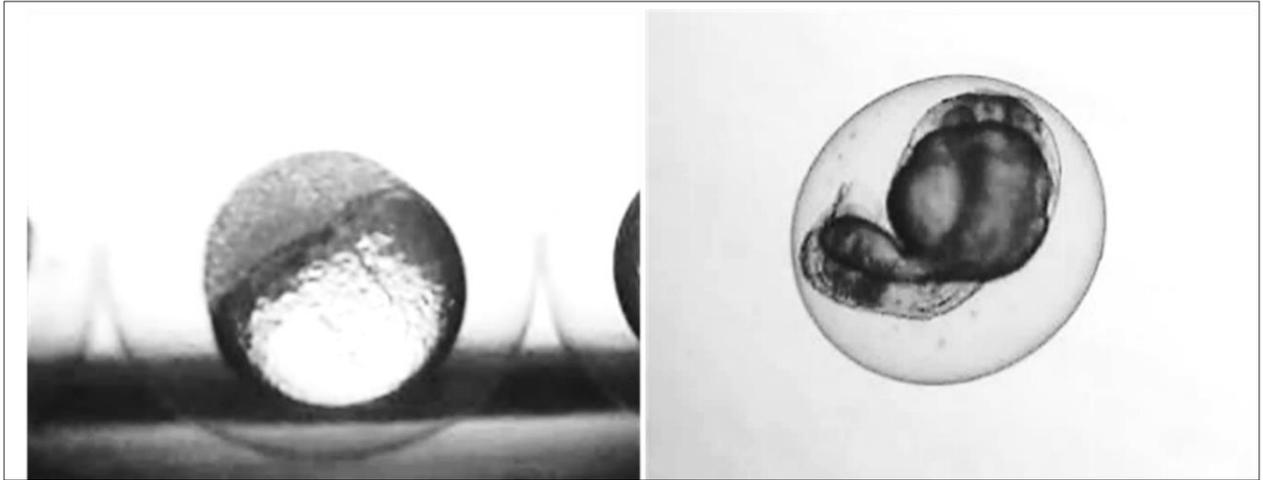


Figura 9: Foto de microscopia óptica mostrando embrião após choque térmico 4mpf a 41,4°C: em 4 hpf houve bom desenvolvimento (à esquerda). Mas no período de 24 horas, houve morte em mais de 98% dos indivíduos (à direita). (Autoria própria, 2022).

Como, não houve nenhum exemplar vivo ao final do período embrionário, a temperatura foi reduzida para 40,4 °C. Porém, nenhum material genético foi duplicado, permanecendo os organismos haploides. A temperatura foi aumentada para 40,6°C com duplicação bem-sucedida e 40,9 °C com morte embrionária neste exemplo.

Acerca da reprodução aplicando o choque térmico a 40,6 °C, a contagem de cromossomos de embriões de controle haploide feita em 24 horas mostrou que 100% das metáfases encontradas apresentaram 25 cromossomos, indicando o sucesso do procedimento de irradiação espermática ($2N=50$ cromossomos) (Figura 10).

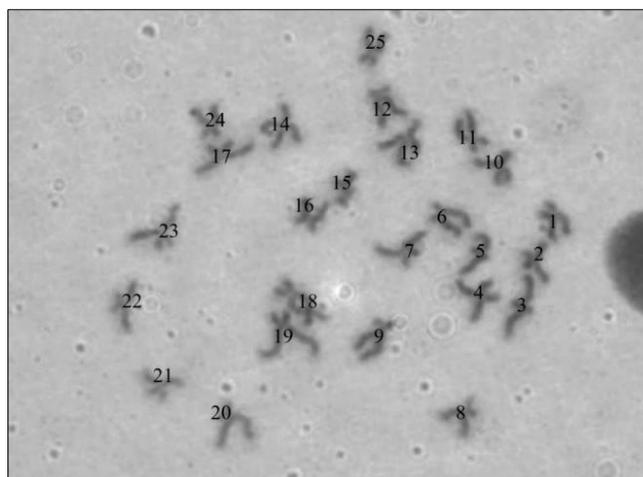


Figura 10:Foto de microscopia ótica, sob aumento de 1000 vezes, mostrando uma metáfase encontrada em controle haploide, com a metade de cromossomos da diploidia da espécie. (Autoria própria, 2022).

Sobre a prole potencialmente ginogenética resultante, foi verificado que, em 48 horas após fertilização, todos os embriões não apresentaram pigmentação da retina

e corpo, ao passo que os embriões do grupo controle diploide apresentaram (Figura 11). Nenhum embrião do controle haploide também apresentou qualquer pigmentação.

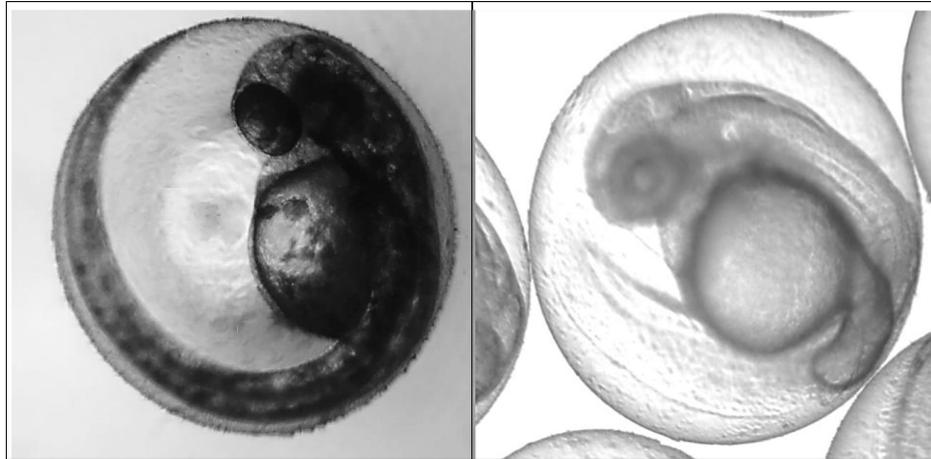


Figura 11: Foto de microscopia óptica mostrando o padrão de pigmentação encontrada nos embriões em 48 hpf. O embrião esquerda é um representante do controle diploide que apresenta pigmentação celular ao longo do corpo e retina. Já o embrião à direita é um representante de ginogênese meiótica sob choque de 40.6°C aplicada dos 4 aos 6 minutos pós fertilização. A imagem evidencia a ausência de pigmentos celulares em tom preto tanto na retina, quanto ao longo do corpo no embrião ginogenético. (Autoria própria, 2022).

Nesse mesmo período, confirmado em 72 horas, todos os embriões de controle haploide, que não foram submetidos à contagem de cromossomos, apresentaram a síndrome haploide intensa, já descrita nesse trabalho, confirmando o sucesso da inativação espermática (Figura 12).

Ao final do período embrionário de 120 horas, foi analisado que todas as larvas do controle diploide apresentaram bexiga natatória inflada, mas nem todos dos ginogenéticos apresentaram tal característica, e essas condições serão melhores discutidas na seção 4.5.

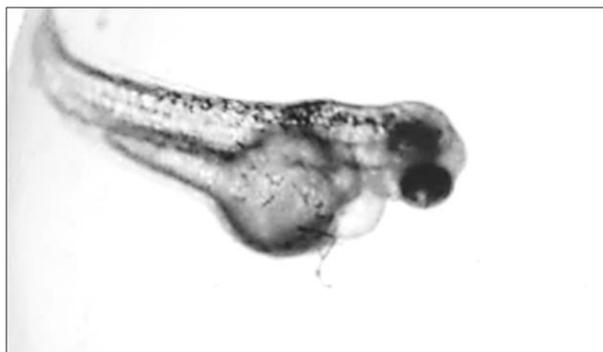


Figura 12: Foto de microscopia óptica ilustrando embrião de controle haploide em 72 hpf. É possível analisar edema de pericárdio e saco vitelino, tamanho encurtado do corpo e elevado grau de lordose, além de tamanho diminuto dos olhos. (Autoria própria, 2022).

4.4. Da padronização de ginogênese mitótica

Foram verificados resultados interessantes quanto a padronização de temperatura. A aplicação de choque térmico de 41,4°C em 18 mpf nos embriões utilizados nesse projeto foi insuficiente para interromper o ciclo celular. O choque de 41,9°C foi suficiente para duplicar o material genético materno, mas 42,45°C foi suficientemente forte para gerar mutações em 98% dos embriões em 6 hpf e matar 100%, em 24 horas de vida (Figura 13).

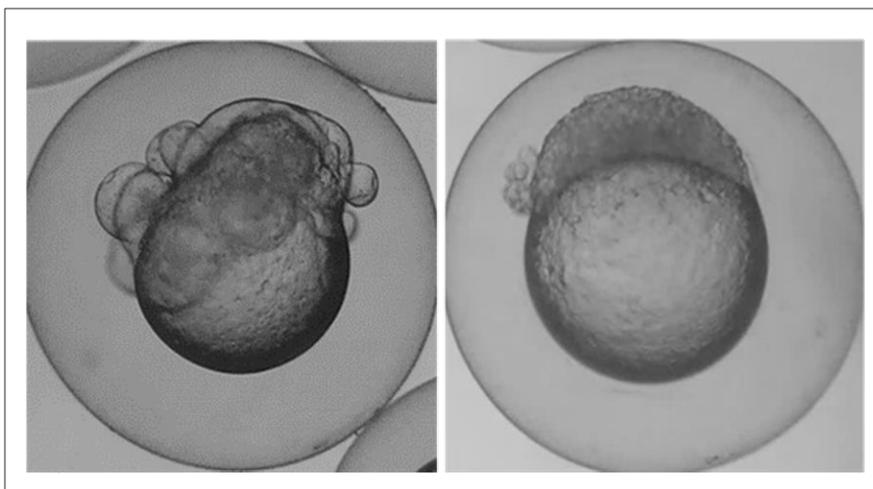


Figura 13: Fotografia de microscopia óptica ilustrando mutações decorrentes do choque térmico a 42,45°C aplicado em embriões haploides no período entre 18 e 20 mpf. Em 3 hpf (à esquerda) e 6 hpf (à direita). (Autoria própria, 2022).

Se tratando da temperatura viável encontrada, 41,9°C, em 0,75 hpf, todos os potenciais embriões foram analisados para verificação do primeiro ponto de checagem do sucesso da ginogênese, conforme proposto por (MENON; NAIR, 2019): análise do atraso de desenvolvimento, em um ciclo celular, dos potenciais ginogenéticos mitóticos frente aos controles diploides e haploides. Nesse momento, foi verificado que parte dos embriões haploides submetidos aos choques térmicos de 41,9°C apresentaram atraso de desenvolvimento embrionário, enquanto outra parte apresentou comportamento igual aos controles, indicando que não houve 100% de sucesso na duplicação (Figura 14).

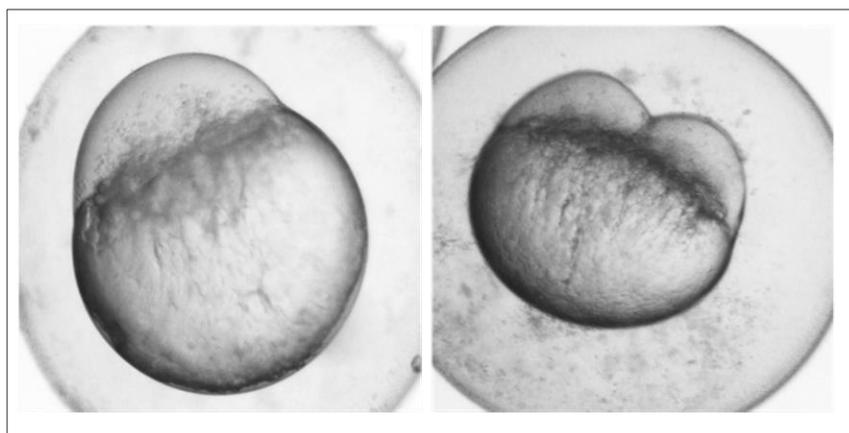


Figura 14: Fotografia de microscopia mostrando os resultados analisados no experimento da aplicação de choque térmico em 41,9°C em embriões haploides para ginogênese mitótica em 0,75 hpf. O embrião à esquerda é de ginogênese mitótica com uma célula. O embrião à direita é de controle diploide com duas células. (Autoria própria, 2022).

Em 24 hpf foi visto que embriões potencialmente ginogenéticos mitóticos apresentaram, em sua maioria, o desenvolvimento esperado, como formação dos olhos e descolamento da cauda, mas controle haploide apresentou cauda curta, conforme mostra a Figura 15.

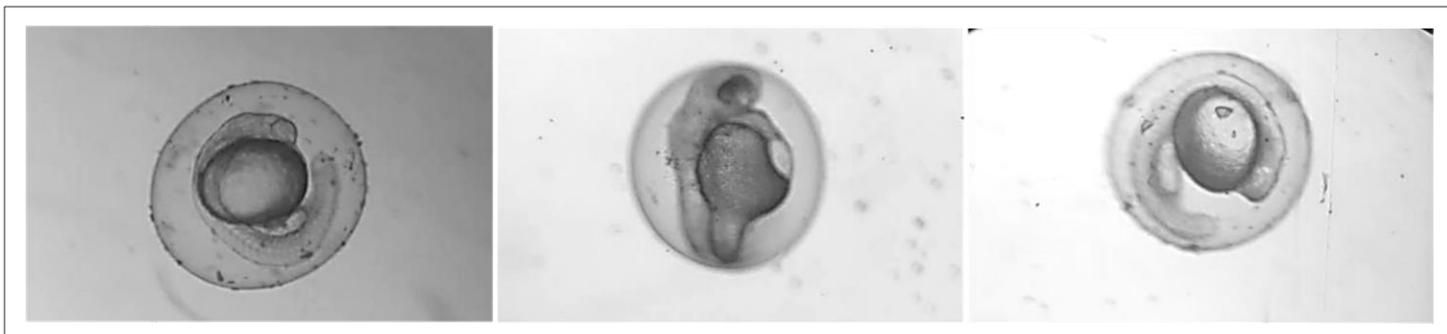


Figura 15: Fotografia de microscopia óptica ilustrando representantes de cada tratamento em 24 hpf sendo controle diploide, controle haploide e ginogenético, respectivamente. Controle e ginogenético estão apresentados com desenvolvimento normal (imagens marginais) e controle haploide com cauda curta (imagem central). (Autoria própria, 2022).

Foi analisado que a maior taxa de mortalidade no tratamento ocorreu em 24 hpf, totalizando mais de 55%, e, como esperado, a maior sobrevivência ocorreu no Controle Diploide, ao passo que a menor sobrevivência ocorreu nos ginogenéticos mitóticos.

Acerca da contagem de cromossomos, todas as metáfases do controle haploide apresentaram 25 cromossomos (Figura 16).

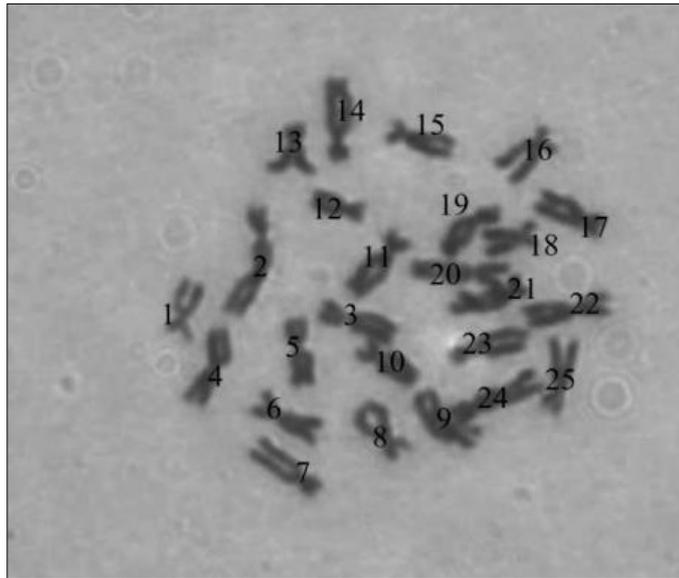


Figura 17: Foto de microscopia ótica, sob aumento de 1000 vezes, mostrando uma metáfase encontrada em controle haploide, com a metade de cromossomos da diploidia da espécie. (Autoria própria, 2022).

Em 48 horas, todos os embriões potencialmente ginogenéticos e haploides não apresentaram qualquer pigmentação ao longo do corpo e retina, ao passo que todos os embriões diploides do controle apresentaram tal característica. Nesse mesmo período embrionário foi analisado a síndrome haploide no controle haploide, a qual foi confirmada em 72 horas (Figura 17).



Figura 16: Foto de microscopia ótica ilustrando controle haploide em 72 hpf. É possível analisar edema de pericárdio e saco vitelino, tamanho encurtado do corpo e elevado grau de lordose, além de tamanho diminuto dos olhos. (Autoria própria, 2022).

Ao final do período embrionário de 120 horas, foi analisado que todas as larvas do controle diploide apresentaram bexiga natatória inflada, mas nem todos dos ginogenéticos apresentaram tal característica.

4.5. Da comparação entre ginogênese mitótica e meiótica quanto ao desenvolvimento da prole

Todas as reproduções ocorridas tiveram uma taxa de fertilização superior a 85%. Enquanto C, H e Mei tinham quatro células, 95% de Mit tinham apenas duas (Figura 18).

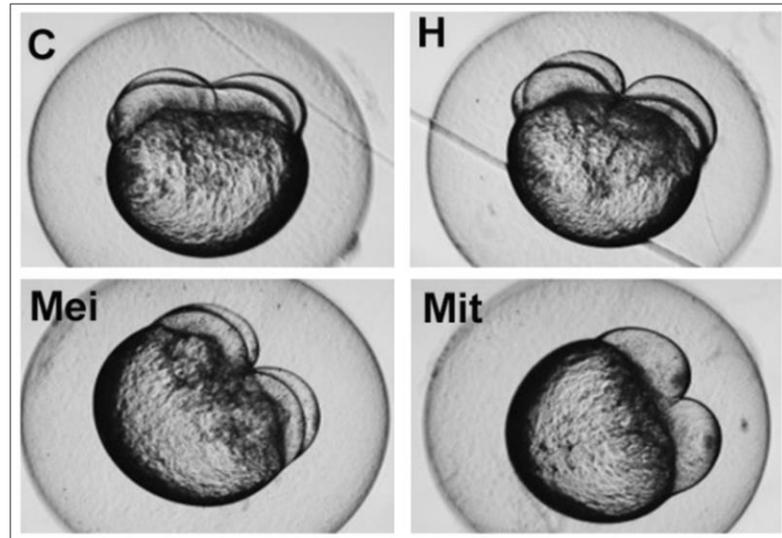


Figura 18: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento do embrião após 1 hora e 20 minutos da fertilização exibindo o número de células em cada grupo: C, H e Mei têm quatro células cada, enquanto Mit tem apenas duas células. (Autoria própria, 2022).

Em 24 hpf, todos os C, bem como a maior parte de Mit e Mei, apresentavam desenvolvimento ocular e desprendimento da cauda, ao passo que todos os H apresentam malformação (Figura 19)

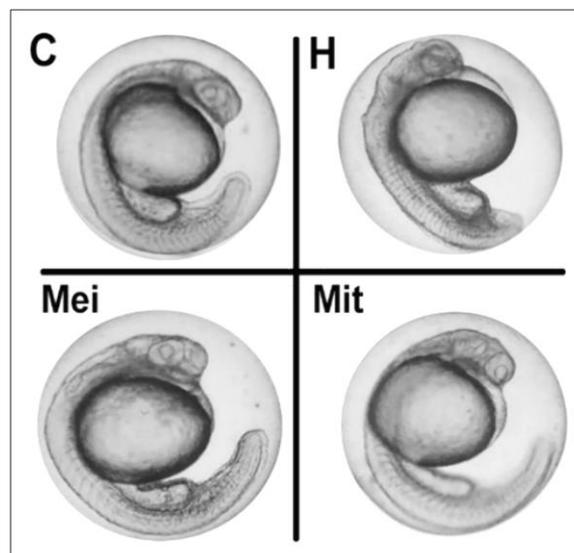


Figura 19: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento do embrião de 24 hpf. C, Mei e Mit tiveram desenvolvimento normal com formação de olhos e descolamento da cauda. H tinha cauda curta e malformação dos olhos. (Autoria própria. 2022).

Enquanto todos os H tinham 25 cromossomos, aproximadamente 93% e 91% das metáfases Mit e Mei, respectivamente, tinham 50 cromossomos, como C. Isso demonstra que os procedimentos de duplicação da meiose e da mitose foram eficazes e que o DNA do esperma foi danificado. Embora tenha sido observado metáfases com número haploide de cromossomos, não foram observadas metáfases Mit e Mei com 25 cromossomos, não houve aneuploidia nos resultados, pois não foram observadas metáfases com números cromossômicos entre 25 e 50 (Figura 20)

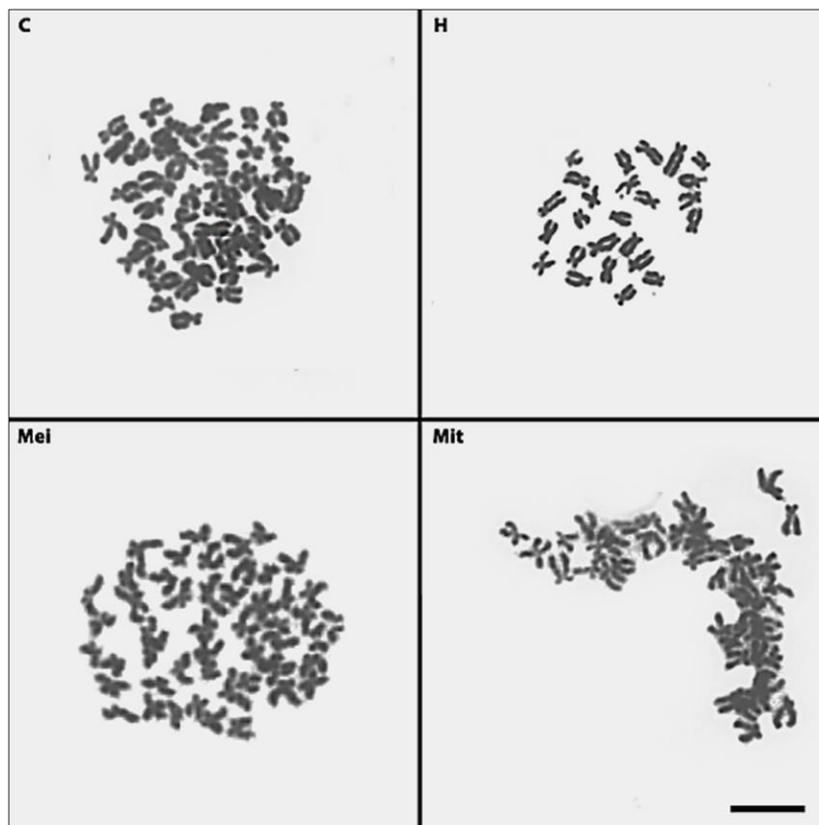


Figura 20: Fotos microscópicas (objetiva de 100x) de embriões de 26 hpf com cromossomos metafásicos, com os grupos C, Mit e Mei contendo 50 cromossomos cada e o grupo H com 25. (Autoria própria. 2022).

Enquanto H, Mit e Mei exibiram hipopigmentação corporal e ocular 48 horas após a fertilização, C apresentou pigmentação selvagem (Figura 21).

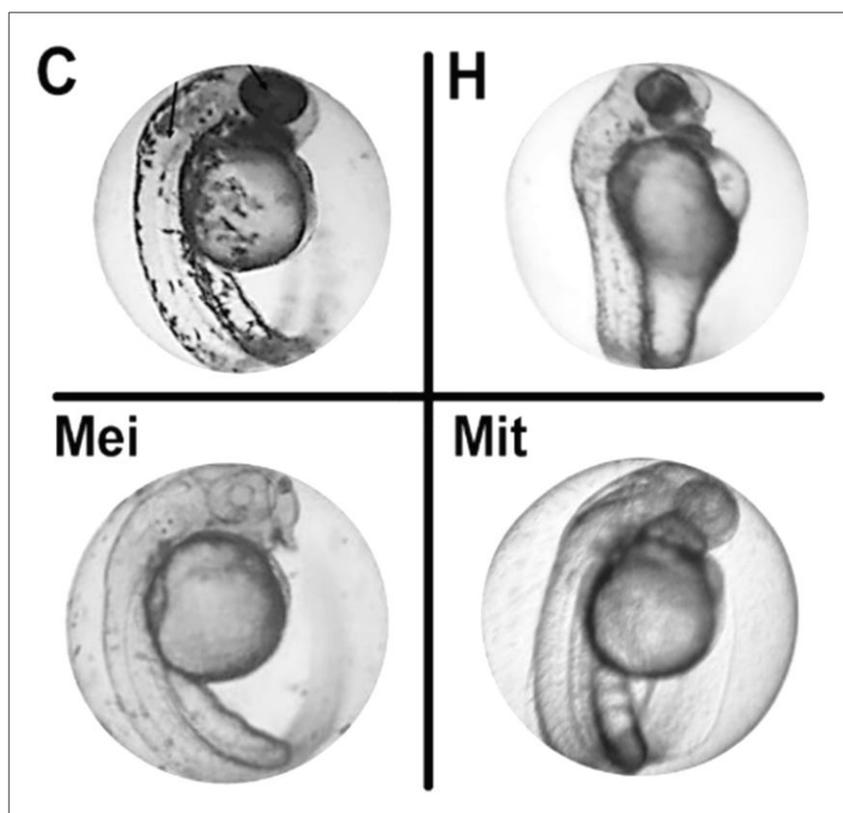


Figura 21: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento de embrião de 48 hpf Grupos C, Mei e Mit com desenvolvimento normal e o grupo H com malformação (Síndrome Haploide). C tinha pigmentação caracterizada por olhos pretos e pontos pretos em todo o corpo, enquanto H, Mei e Mit não tinham pontos pretos no corpo e os olhos não eram pretos. (Autoria própria. 2022).

Todos os C tiveram desenvolvimento normal aos 72 hpf, mas cerca de 20% dos Mei e 10% dos Mit apresentaram malformações, incluindo todas as características já mencionadas, e esses percentuais persistiram até 120 hpf. Em 72 hpf, todos os H apresentaram síndrome haploide grave, conforme demonstrado em (MIZGIREV; REVSKOY, 2010) (Figura 22)

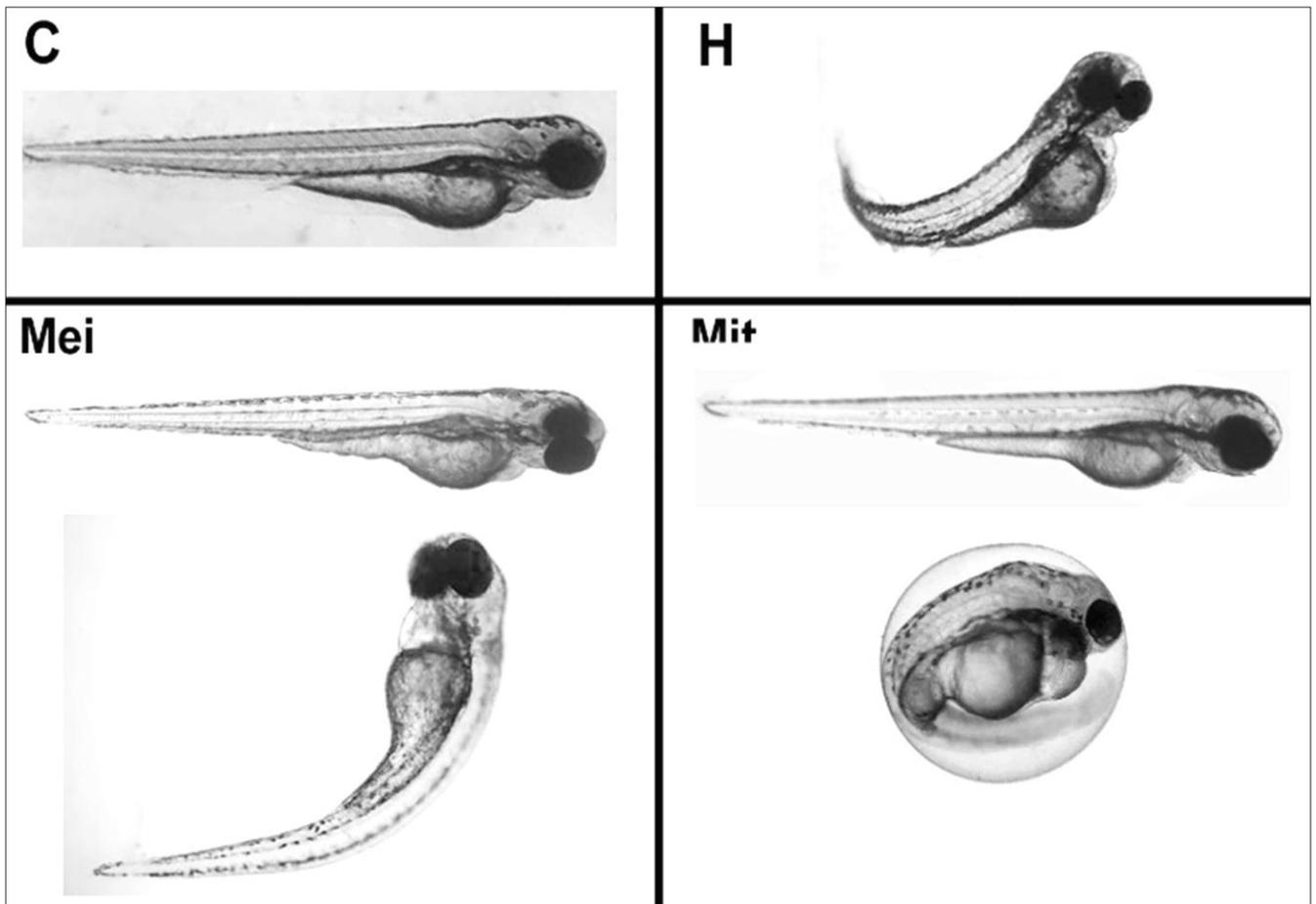


Figura 22: Foto de microscopia mostrando desenvolvimento larval de 72 hpf mostrando: Grupos C com desenvolvimento normal; grupos H com síndrome haploide caracterizada por corpo encurtado, tamanho reduzido dos olhos, edema do pericárdio e falha na circulação do tronco; duas amostras de larvas dos grupos Mei e Mit com desenvolvimento normal; e lordose, edema pericárdico, retardo de eclosão, respectivamente. (Autoria própria. 2022).

Aos 120 hpf, todos os C apresentaram bexiga natatória inflada, mas nem todos os Mit e Mei apresentaram tal condição (Figura 23).

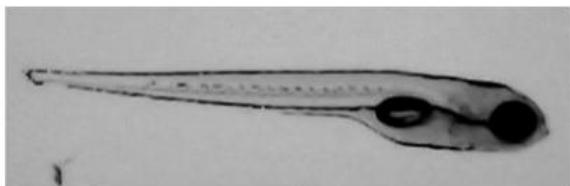
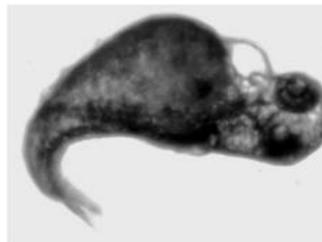
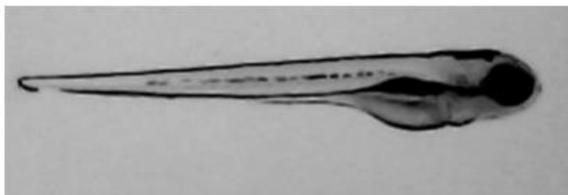
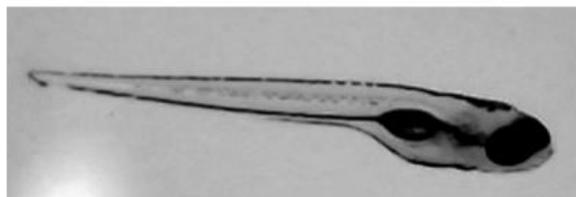
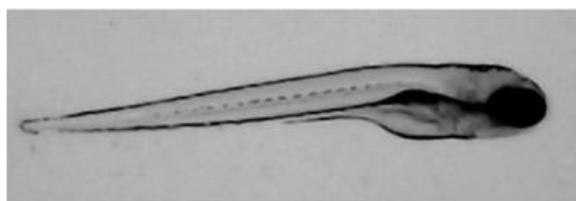
C**H****Mei****Mit**

Figura 23: Foto de microscopia mostrando o desenvolvimento larval de 120 hpf mostrando: Grupos C com desenvolvimento normal; duas amostras de larvas dos grupos Mit e Mei ((Mei A e Mit A) com anatomia normal e sem bexiga inflada, respectivamente. (Autoria própria. 2022).

Cada terapia mostrada teve efeitos diferentes sobre deformidades, sobrevivência e saúde. O grupo Mit tem a menor média de sobrevivência, seguido por H e Mei, conforme gráfico (A) (Gráfico 2). A taxa de sobrevivência para o grupo controle foi de 100%. O grupo H tem a maior média de sobrevivência, seguido do Mei e do Mit, como mostra o gráfico (B) (Gráfico 2). O grupo livre de malformações foi o controle. O grupo Mei, seguido por Mit e H, apresenta o maior percentual de larvas saudáveis, conforme gráfico (C) (Gráfico 2). Todos os animais do grupo de controle estavam em boas condições de saúde.

Zebrafish Larvae (120 hpf)

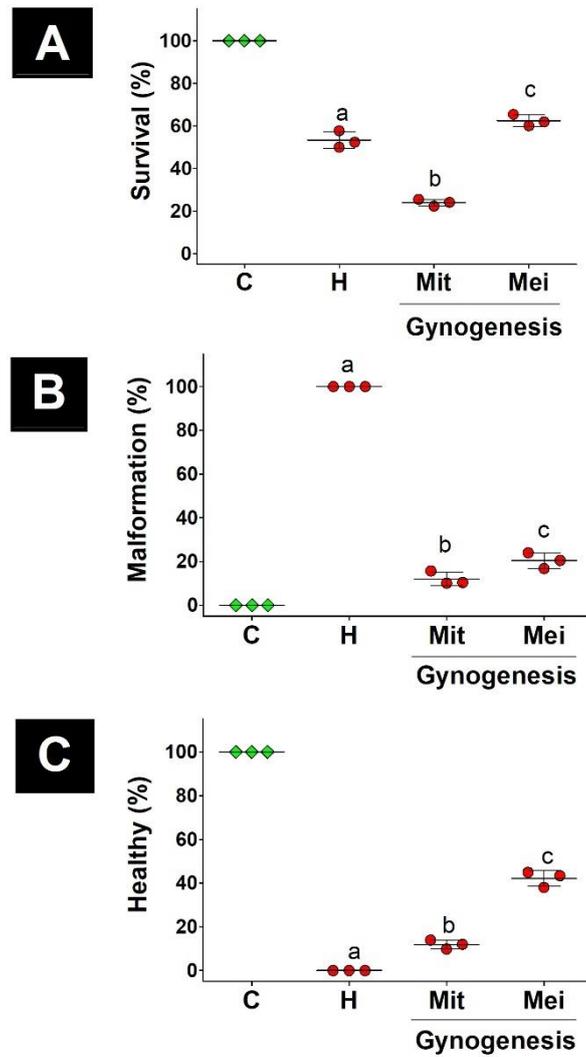


Gráfico 2: Gráficos exibindo os valores médios (desvio padrão) das taxas de sobrevivência, malformações e taxa de larvas saudáveis em 120 hpf. Os dados foram analisados usando o teste Anova de 1 via, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas com valor $p < 0,05$. (Autoria própria. 2022).

5. DISCUSSÃO

A literatura tem descrito métodos utilizando choque térmico e de pressão para produzir diferentes peixes com ginogênese mitótica e meiótica, respectivamente (FOISIL; CHOURROUT, 1992; LOU; PURDOM, 1984; MORGAN et al., 2006; PELEGRI; SCHULTE-MERKER, 1998; PERUZZI; CHATAIN, 2003; VOLCKAERT et al., 1994). Entretanto, os protocolos que utilizam valores de temperatura não apresentam 100% de reprodutibilidade, e os protocolos que utilizam valores de pressão requerem equipamentos complicados e caros, nem sempre disponíveis.

Em função da simplicidade da abordagem proposta nesse trabalho, é possível ajustar os valores de temperatura e irradiação espermática em função da sensibilidade da linhagem de Zebrafish, trazendo métodos de confirmação do sucesso do procedimento de baixos custos. Considerando tal sensibilidade, essa abordagem sistematiza uma técnica que se baseia apenas no choque térmico para produzir animais ginogenéticos meióticos e mitóticos. A discussão sobre a estratégia ótima para a criação de linhagens com genética definida e a comparação da capacidade de sobrevivência de animais produzidos por ginogênese meiótica e mitótica são contribuições únicas deste estudo. Nesse contexto, a utilização da ginogênese para criar linhagens de isogenia ou com genética conhecida pode satisfazer o rigor que a pesquisa exige quanto ao conhecimento e uniformidade da genética de animais de laboratório.

Quando realizada três ou mais vezes, a ginogênese meiótica pode ser mais vantajosa do que a ginogênese mitótica para a criação de uma linhagem geneticamente conhecida (ARAI, 2001). Quando a ginogênese meiótica é repetida na progênie, os loci distal e proximal serão fixados como uma condição contínua de heterozigoto e homozigoto, resultando em um clone heterozigoto (ARAI, 2001; LIU et al., 2010). Este estudo mostrou que a ginogênese meiótica tem essa vantagem, pois gera mais embriões saudáveis e reduz a mortalidade da prole (Gráfico 2). Nas gerações subsequentes, a taxa de sobrevivência de indivíduos ginogenéticos meióticos parece aumentar, o que pode estar relacionado ao declínio de genes recessivos letais como demonstrado por (JIANG et al., 2017).

Nesse trabalho, foi visto que há maior sobrevivência quando a temperatura é menor, como foi observado na ginogênese meiótica. Mas com isso, foi encontrado maior incidência de deformidades. Entretanto, a mortalidade total na ginogênese

mitótica é maior que a mortalidade somada às malformações na ginogênese meiótica, resultando em quantidade menores de animais sadios ao final de 120 hpf, resultados que complementam os estudos de (ARAI, 2001; KOMEN; THORGAARD, 2007; NASCIMENTO et al., 2020). A expressão gênica reduzida também foi observada em linhagens ginogenéticas produzidas em altas temperaturas em outros trabalhos (JESUS et al., 2016; YEBRA-PIMENTEL et al., 2019; YU et al., 2022).

Interromper um ciclo celular requer uma temperatura cerca 1,3°C superior em relação a retenção do segundo corpúsculo polar, o que implica que os embriões iniciais são frágeis e não podem suportar as mesmas temperaturas que os embriões ligeiramente mais velhos. Assim, esse trabalho demonstra que um tempo breve é essencial para determinar a fragilidade dos embriões devido ao rápido desenvolvimento do Zebrafish. A expressão de genes recessivos letais como resultado da homozigose aumentada pode ser outra explicação para a maior taxa de mortalidade no grupo Mit em comparação com o grupo Mei.

Divisão celular, contagem de cromossomos, fenótipo e síndrome haploide foram usados como indicadores do sucesso dos parâmetros relacionados à ginogênese e apontam para a aplicação adequada da metodologia corroborando (BAARS et al., 2016; MENON; NAIR, 2019; WESTERFIELD, 2007) e ampliando as formas de verificar o sucesso do procedimento. Eles também apoiam e ampliam as abordagens que são facilmente acessíveis em muitos laboratórios que desejam usar o conceito básico de ginogênese em Zebrafish para uma ampla gama de propósitos de pesquisa, como mutação materna e triagem haploide, como foi feito por (LAYTON, 2009; PELEGRI et al., 2004; PELEGRI; SCHULTE-MERKER, 1998).

Depois de sofrer o choque de temperatura ideal para a duplicação completa do genoma materno, os embriões Mit exibiram duas células, enquanto os embriões Mei, C e H revelaram quatro. Isso provavelmente ocorreu como resultado do choque térmico que interrompeu o ciclo celular embrionário dos embriões Mit e atrasou a divisão celular. Isso não ocorre em Mei porque quando o segundo corpúsculo polar é retido para diploidização por essa abordagem, os ciclos de duplicação celular não são interrompidos, provando que a operação de ginogênese mitótica foi bem-sucedida, conforme mostrado por (MENON; NAIR, 2019).

Os embriões com 26 horas têm alta taxa de mitose porque estão na fase de proliferação celular do desenvolvimento embrionário, o que facilita a contagem das metáfases e garante a precisão dos dados, e esta é a mesma ideia publicada por

(MENON; NAIR, 2019). A porcentagem de embriões do grupo Mit de 2 células é semelhante à porcentagem de metáfases 2N e larvas caracteristicamente diploides em 120 hpf (95% no estágio de 2 células e ~97% para os outros parâmetros de diploidização). Da mesma forma, o percentual de metáfases no grupo Mei corrobora o percentual de larvas diploides a 120 hpf (cerca de 91% de diploidização), o que complementa os trabalhos de (MENON; NAIR, 2019; MIZGIREV; REVSKOY, 2010; WESTERFIELD, 2007) ao mostrar a eficácia do uso dessas metodologias combinadas para obter maior confiabilidade dos resultados.

Sobre o fenótipo dourado, além de servir como indicador visível de ginogênese nesse contexto, a condição é utilizada em estudos de transplantes nucleares ou mesmo na análise de gametas criopreservados como utilizado por (HATTORI et al., 2011; HIGAKI et al., 2010)A vantagem desse fenótipo é que não é um gene geneticamente organismo modificado, ampliando seu uso. A síndrome haploide, por fim, representa uma alternativa que está disponível para muitos laboratórios como forma de confirmar a irradiação espermática adequada como mostrado por (MENON; BHATTRAI; NAIR, 2017; MIZGIREV; REVSKOY, 2010). Assim, esse trabalho estende a definição de ginogênese efetiva para incluir também contagem de cromossomos, mutação recessiva feminina e síndrome haploide.

Como o uso de "pressão" para obter ginogenética meiótica necessita de ferramentas mais especializadas, este trabalho sugere o uso de temperatura. Além disso, foi utilizado um tempo diferente do indicado para choque de pressão (1,4-6 mpf) em Zebrafish como o proposto por (STREISINGER et al., 1981; WESTERFIELD, 2007), e foi seguido o tempo descrito por (FUKUSHIMA et al., 2012) que aplicou em outra espécie a técnica. Com isso, foi introduzido o uso de choque térmico para reter o segundo corpúsculo polar, antes usado apenas na piscicultura para produzir triploidia como mostrado por (BENFEY; SUTTERLIN, 1984; DON; AVTALION, 1986; PRADEEP et al., 2012; SOLAR; DONALDSON; HUNTER, 1984). Além disso, foi estendido o conceito de produzir uma linhagem com genética conhecida, que inicialmente se acreditava ser conquistada apenas por meio da ginogênese mitótica. De toda forma, a ginogênese mitótica aqui proposta ocorre a uma temperatura maior que em investigações anteriores (MIZGIREV; REVSKOY, 2010; WESTERFIELD, 2007) (41,4°C) e menor que em (37) (42°C). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a prole tem uma chance maior de sobrevivência até a maturidade com bons cuidados durante a larvicultura: ~10%-14% ao contrário de (MIZGIREV;

REVSKOY, 2010), que estimativa menos de 5%. Nesse contexto, outras linhagens de peixes ginogenéticos apresentaram alterações na expressão de genes ligados à estabilidade do genoma e ao reparo do DNA (FAN et al., 2016; YU et al., 2022).

Em relação às distintas dosagens de UV-C expostas neste trabalho, a utilização de uma dosagem obtida em menor tempo — apenas 20 segundos — garante que os espermatozoides fiquem vulneráveis por um menor período em um ambiente hostil, aumentando a probabilidade de sobrevivência, uma ideia diferente de (MENON; BHATTARAI; NAIR, 2017; MIZGIREV; REVSKOY, 2010). Isso demonstra que é mais prático montar câmaras de irradiação com lâmpadas potentes e com refletores que concentram e intensificam a luz na amostra.

A questão da sensibilidade inerente de cada cepa à irradiação e choque térmico em cada estudo de pesquisa é relevante e importante neste estudo e outros autores não explicam isso. A utilização de outras linhagens, mesmo com o similar padrão de cuidado, pode produzir resultados diferentes, corroborando com a exigência de utilização de animais geneticamente definidos. Isso torna o conceito do estudo ainda mais aplicável a todas as outras áreas que utilizam esse modelo animal, bem como estudos que utilizam a técnica de ginogênese como produto.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que a sensibilidade da cepa utilizada está intimamente relacionada ao sucesso da ginogênese, seja ela meiótica ou mitótica. É fundamental que cada pesquisador esteja atento a essa sensibilidade e altere cada parâmetro envolvido no processo, desde a irradiação do esperma até o choque térmico. Foi demonstrado como construir um método de produção de ginogênese utilizando apenas choque térmico em vez de choque de pressão, introduzindo novos métodos adequados para maximizar a saúde da progênie em ginogênese mitótica. Além disso, foi descoberto que a manutenção do segundo corpúsculo polar na produção da ginogenética meiótica requer temperaturas mais baixas do que na produção da ginogenética mitótica, que requer a interrupção de um ciclo celular. A prole da ginogênese meiótica também parece ser mais viável.

7. REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, ANTENOR. **Animais de laboratório : criação e experimentação**. [s.l.] Editora Fiocruz, 2002.
2. ARAI, K. **Chromosome Manipulation in Aquaculture: Recent Progress and Perspective**SUISANZOSHOKU. [s.l: s.n.].
3. ARAI, K. **Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan**Aquaculture. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.nl/locateraqua-online>.
4. BAARS, D. L. et al. Ploidy manipulation of zebrafish embryos with heat shock 2 treatment. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 118, 16 dez. 2016.
5. BENFEY, T. J.; SUTTERLIN, A. M. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 36, n. 4, p. 359–367, fev. 1984.
6. BERTOTTO, D. et al. Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis. **Aquaculture**, v. 246, n. 1–4, p. 115–124, maio 2005.
7. CAI, M. et al. Artificial induction of mito-gynogenetic diploids in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by hydrostatic pressure. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 28, n. 4, p. 713–719, 29 jul. 2010.
8. DAS, S.; PATEL, B. Marine resources and animals in modern biotechnology. Em: **Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 567–591.
9. DON, J.; AVTALION, R. R. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, n. 2, p. 186–192, 1986.
10. EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia Culture**. [s.l.] Elsevier Science & Technology, 2019.
11. FAN, Z. et al. Characterization of Embryo Transcriptome of Gynogenetic Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 545–553, 17 out. 2016.
12. FISH, A. I. N. subsequent parthenogenetic development of the egg. This "Hertwig. p. 431–445, 1962.
13. FOISIL, L.; CHOURROUT, D. Chromosome doubling by pressure treatments for tetraploidy and mitotic gynogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

- (Walbaum): re-examination and improvements. **Aquaculture Research**, v. 23, n. 5, p. 567–575, set. 1992.
14. FOPP-BAYAT, D.; KOLMAN, R.; WOZNICKI, P. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester sperm. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 54–58, abr. 2007.
 15. FRANĚK, R. et al. **Isogenic lines in fish – a critical review**. **Reviews in Aquaculture** Wiley-Blackwell, , 1 ago. 2020.
 16. FUKUSHIMA, H. et al. **Triploidy in the hematology of jundia juveniles (Siluriformes: Heptapteridae)** **Braz. J. Biol.** [s.l: s.n.].
 17. GESTL, E. E. et al. New Conditions for Generation of Gynogenetic Half-Tetrad Embryos in the Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Heredity**, v. 88, n. 1, p. 76–79, 1 jan. 1997.
 18. HATTORI, M. et al. Nuclear Transfer of Embryonic Cell Nuclei to Non-nucleated Eggs in Zebrafish, *Danio rerio*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 4, p. 460–468, 2011.
 19. HIGAKI, S. et al. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. **REPRODUCTION**, v. 139, n. 4, p. 733–740, abr. 2010.
 20. JESUS, T. F. et al. Transcriptome profiling of two Iberian freshwater fish exposed to thermal stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 55, p. 54–61, jan. 2016.
 21. JIANG, H. et al. Fast development of genetically uniform strains by gynogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 5, p. 2032–2038, 16 maio 2017.
 22. KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, jul. 1995.
 23. KOBAYASHI, T. et al. Production of Cloned Amago Salmon <i>Oncorhynchus rhodurus</i>. **Fisheries science**, v. 60, n. 3, p. 275–281, 1994.
 24. KOMEN, H.; THORGAARD, G. H. **Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review**. **Aquaculture**, 14 set. 2007.
 25. KOMEN, J. et al. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 92, p. 127–142, jan. 1991.

26. LAMASON, R. L. et al. SLC24A5, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. **Science**, v. 310, n. 5755, p. 1782–1786, 16 dez. 2005.
27. LAYTON, J. E. Undertaking a Successful Gynogenetic Haploid Screen in Zebrafish. Em: [s.l: s.n.]. p. 31–44.
28. LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. **Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. Nature Reviews Genetics**, maio 2007.
29. LIU, H. et al. Genetic difference between meiotic gynogenesis and mitotic gynogenesis in the Japanese flounder. **JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA**, v. 34, n. 6, p. 718–724, 19 ago. 2010.
30. LIU, J. et al. **CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling. Human Genetics** Springer Verlag, , 1 jan. 2017.
31. LOU, Y. D.; PURDOM, C. E. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v. 24, n. 6, p. 665–670, jun. 1984.
32. MANAN, H. et al. A review of gynogenesis manipulation in aquatic animals. **Aquaculture and Fisheries**, v. 7, n. 1, p. 1–6, jan. 2022.
33. MENON, T.; BHATTRAI, J.; NAIR, S. Effective Generation of Gynogenic Haploid Zebrafish Embryos Using Low Dosage of UV Rays. **Matters Select**, 6 out. 2017.
34. MENON, T.; NAIR, S. Experimental manipulation of ploidy in zebrafish embryos and its application in genetic screens. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 1920p. 111–128.
35. MIMS, S. D. et al. Induced Meiotic Gynogenesis of Paddlefish *Polyodon spathula*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 28, n. 4, p. 334–343, dez. 1997.
36. MIZGIREV, I.; REVSKOY, S. Generation of clonal zebrafish lines and transplantable hepatic tumors. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 383–394, mar. 2010.
37. MORGAN, A. J. et al. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm. **Aquaculture**, v. 259, n. 1–4, p. 290–299, set. 2006.

38. MÜLLER-BELECKE, A.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Performance testing of clonal *Oreochromis niloticus* lines. **Aquaculture**, v. 184, n. 1–2, p. 67–76, abr. 2000.
39. NARUSE, K. et al. The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of Experimental Zoology**, v. 236, n. 3, p. 335–341, dez. 1985.
40. NASCIMENTO, N. F. DO et al. The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism. **Aquaculture**, v. 514, p. 734432, jan. 2020.
41. PANDIAN, T. J.; KOTEESWARAN, R. Ploidy induction and sex control in fish. **Hydrobiologia**, v. 384, n. 1/3, p. 167–243, 1998.
42. PASCHOS, I. et al. Induction of Gynogenesis and Androgenesis in Goldfish *Carassius auratus* (var. *oranda*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3–4, p. 195–198, ago. 2001.
43. PELEGRI, F. et al. Identification of recessive maternal-effect mutations in the zebrafish using a gynogenesis-based method. **Developmental Dynamics**, v. 231, n. 2, p. 324–335, out. 2004.
44. PELEGRI, F.; SCHULTE-MERKER, S. Chapter 1 A Gynogenesis-Based Screen for Maternal-Effect Genes in the Zebrafish *Danio rerio*. Em: **Methods in Cell Biology**. [s.l.] Elsevier, 1998. v. 60p. 1–20.
45. PERUZZI, S.; CHATAIN, B. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. **Aquaculture**, v. 189, n. 1–2, p. 23–37, set. 2000.
46. PERUZZI, S.; CHATAIN, B. Induction of Tetraploid Gynogenesis in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Genetica**, v. 119, n. 2, p. 225–228, 2003.
47. PRADEEP, P. J. et al. Triploidy induction by heat-shock treatment in red tilapia. **Caryologia**, v. 65, n. 2, p. 152–156, 11 jun. 2012.
48. PURDOM, C. E. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. **Heredity**, v. 24, n. 3, p. 431–444, ago. 1969.
49. RINCHARD, J.; DABROWSKI, K.; GARCIA-ABIADO, M. High efficiency of meiotic gynogenesis in sea lamprey *Petromyzon marinus*. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 306B, n. 6, p. 521–527, 15 nov. 2006.

50. SANTOS, B. F. DOS. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético . Em: **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002.
51. SHINYA, M.; SAKAI, N. Generation of highly homogeneous strains of zebrafish through full sib-pair mating. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 1, n. 5, p. 377–386, out. 2011.
52. SOLAR, I. I.; DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. **Aquaculture**, v. 42, n. 1, p. 57–67, nov. 1984.
53. STREISINGER, G. et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293–296, maio 1981.
54. SUWA, M.; ARAI, K.; SUZUKI, R. Suppression of the First Cleavage and Cytogenetic Studies on the Gynogenetic Loach. **Fisheries science**, v. 60, n. 6, p. 673–681, 1994.
55. THORGAARD, G. H. Chromosomal Differences among Rainbow Trout Populations. **Copeia**, v. 1983, n. 3, p. 650, 16 ago. 1983.
56. VOLCKAERT, F. A. M. et al. Gynogenesis in the African catfish (*Clarias gariepinus*). I. Induction of meiogynogenesis with thermal and pressure shocks. **Aquaculture**, v. 128, n. 3–4, p. 221–233, dez. 1994.
57. WALKER, C.; WALSH, G. S.; MOENS, C. Making gynogenetic diploid zebrafish by early pressure. **Journal of Visualized Experiments**, n. 28, 2009.
58. WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)**. 5. ed. Oregon : [s.n.].
59. YEBRA-PIMENTEL, E. S. et al. Deep transcriptome analysis of the heat shock response in an Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) cell line. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 508–517, maio 2019.
60. YU, F. et al. Heat Shock Procedure Affects Cell Division-Associated Genes in Gynogenetic Manipulation. **Marine Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 354–365, 19 abr. 2022.