

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**MARÍLIA LAZAROTTO**

**RNAS MENSAGEIROS (mRNAs) COMO INDICADORES DA QUALIDADE DE  
GAMETAS EM PEIXES**

**Uruguiana  
2021**

**MARÍLIA LAZAROTTO**

**RNAS MENSAGEIROS (mRNAs) COMO INDICADORES DA QUALIDADE DE  
GAMETAS EM PEIXES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientador: Carlos Frederico Ceccon  
Lanes

**Uruguaiana  
2021**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

L111r Lazarotto, Marília

RNAs mensageiros (mRNAs) como indicadores da qualidade de gametas em peixes / Marília Lazarotto. – 2021.  
54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Pampa, AQUICULTURA – 2021  
“Orientação: Carlos Frederico Ceccon Lanes”

1. espermatozoides. 2. ovócitos. 3. reprodução. 4. Transcritos.  
5. trasncriptoma. I. Título.

**MARÍLIA LAZAROTTO**

**RNAS MENSAGEIROS (mRNAs) COMO INDICADORES DA QUALIDADE  
DE GAMETAS EM PEIXES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Tecnólogo em Aquicultura.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 30, setembro de 2021.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Frederico Ceccon Lanes

Orientador

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

---

Prof. Dra. Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku Neis

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Rafael Yutaka Kuradomi

Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Assinado eletronicamente por **CARLOS FREDERICO CECCON LANES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/10/2021, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Rafael Yutaka Kuradomi, Usuário Externo**, em 06/10/2021, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU NEIS, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/10/2021, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0632868** e o código CRC **D8CEDF87**.

Dedico este trabalho ao meu orientador, a  
minha esposa e família.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador por todo o tempo e dedicação que me foram prestados, seus ensinamentos foram muito importantes para chegar até aqui. Sobretudo por acreditar em mim, sem dúvida isso foi fundamental. Destaco ainda o acompanhamento incondicional durante todo o processo, suas críticas construtivas foram uma grande contribuição para o meu crescimento profissional. Serei eternamente grata por me impulsionar e mostrar o mundo fantástico que é a Biologia Molecular da reprodução.

Aos professores que também fizeram parte dessa trajetória. Em especial a professora Alessandra por quem tenho muito carinho e admiração. Obrigada por compartilhar com muita dedicação seus conhecimentos, o amor pelo que faz reflete em cada um dos seus alunos. Na minha vida profissional carregarei muito do seu legado.

Por fim e não menos importantes, aos amigos que fiz durante a graduação, com certeza trabalharemos juntos ainda.

Meu muito obrigada a todos vocês.

“A nossa maior glória  
não reside no fato de nunca  
cairmos,  
mas sim em levantarmo-nos sempre  
depois de cada queda.”

Confúcio

## RESUMO

A qualidade dos gametas produzidos pelos peixes mantidos em cativeiro, ainda, é altamente variável e tem sido considerada um dos problemas para expansão da piscicultura. As condições de cultivo, os fatores ambientais e os parâmetros genéticos e fisiológicos dos animais são fatores que afetam a produção e a qualidade dos gametas em cativeiro. Na aquicultura, o uso de gametas de boa qualidade é essencial para a produção de larvas viáveis, entretanto, a avaliação dos gametas é um processo baseado na maioria das vezes apenas nas características básicas dos gametas. Nos machos, as análises mais comuns utilizadas para avaliar a qualidade dos espermatozoides são: avaliação da motilidade, concentração celular e morfologia dos espermatozoides. Nas fêmeas, as avaliações mais empregadas são as estimativas de fertilização, eclosão e de larvas normais, a quantificação do número total de ovócitos produzidos e o tamanho dos ovócitos. No entanto, os recentes avanços na área da biologia molecular aplicados à reprodução têm permitido a descoberta de transcritos paternos e maternos que estão envolvidos com a qualidade dos gametas. Embora os estudos em peixes ainda estejam em fase inicial, esses conjuntos de RNAs mensageiros (mRNAs) que são acumulados durante o processo da gametogênese e que estão envolvidos em diferentes processos celulares parecem ser essenciais para a fertilização e para o desenvolvimento bem-sucedido do embrião. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre o uso de transcritos paternos e maternos como indicadores da qualidade de gametas em teleósteos. O levantamento dos transcritos paternos e maternos que vem sendo estudados especialmente em espécies como o zebrafish (*Danio rerio*), o bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*), o Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e na enguia do Japão (*Anguilla japonica*) deverá auxiliar nos futuros estudos com as espécies nativas brasileiras.

**Palavras-Chave:** espermatozoides, ovócitos, reprodução, transcritos, transcriptoma.

## ABSTRACT

The quality of gametes in farmed broodstock is still highly variable and has been considered one of the major problems for the expansion of fish farming. The culture conditions, the environmental factors and the genetic and physiological parameters of the animals are factors that affect the gamete production and quality in farmed fish. In aquaculture, the use of high quality gametes is essential for the production of viable larvae, however, the evaluation of gamete quality is based only on basic characteristics of gametes. In males, the most common analysis used to evaluate sperm quality are motility, cell concentration and sperm morphology. In females, the determination of the rates of fertilization, hatching and normal larvae, as well as, the quantification of the total number of oocytes produced and oocyte diameter are the parameters used to evaluate egg quality. However, the recent advances in molecular biology applied to reproduction have allowed the discovery of paternal and maternal transcripts that are involved with gamete quality. Although these studies are still in ongoing in fish, these messenger RNAs (mRNAs), that are accumulated during the gametogenesis process and are involved in different cellular processes, seem to be essential for fertilization and successful embryo development. Thus, the aim of this study is to perform a literature review on the use of paternal and maternal transcripts as indicators of gamete quality in teleosts. The researches on paternal and maternal transcripts that have been performed especially in species such as zebrafish (*Danio rerio*), Atlantic cod (*Gadus morhua*), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and Japanese eel (*Anguilla japonica*) might help in future studies with native Brazilian species.

**Keywords:** spermatozoids, oocytes, reproduction, transcripts, transcriptome.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais fatores que afetam os reprodutores durante a produção de gametas (A) e os principais parâmetros que podem ser utilizados para determinar a qualidade dos gametas em peixes (B). .....24
- Figura 2.** Representação dos níveis de transcritos maternos e zigóticos durante o desenvolvimento embrionário de peixes. Transição materno-zigótica é o período em que os transcritos zigóticos são ativados e os transcritos maternos são degradados. ....30

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Transcritos paternos relacionados à qualidade de gametas em teleósteos.  
28

**Tabela 2.** Transcritos maternos relacionados à qualidade de gametas em teleósteos.  
32

## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 CONTROLE ENDÓCRINO DA REPRODUÇÃO EM TELEÓSTEOS .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 GAMETOGÊNESE EM TELEÓSTEOS .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS GAMETAS .....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>23</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>PRESENÇA E ACÚMULO DE RNAS NOS ESPERMATOZOIDES .....</b>	<b>25</b>
<b>RNAS MENSAGEIROS (MRNA) COMO INDICADORES DA QUALIDADE DO SÊMEN .....</b>	<b>27</b>
<b>ACÚMULO DE TRANSCRITOS MATERNOS E O CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO .....</b>	<b>29</b>
<b>TRANSCRITOS MATERNOS COMO INDICADORES DA QUALIDADE DE OVÓCITOS E EMBRIÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>ESTUDOS TRANSCRIPTÔMICOS COM PEIXES NATIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>42</b>
<b>5 ANEXOS – NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL.....</b>	<b>50</b>

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O Brasil possui um enorme potencial para o desenvolvimento e investimento de tecnologias voltadas para a aquicultura, uma vez que, apresenta condições climáticas favoráveis e um vasto potencial hídrico para criação de organismos aquáticos (FAO, 2016). Em 2020, somente na área piscícola, o país ultrapassou a marca de 800.000 toneladas de peixes de cultivo, aumentando as expectativas para os próximos anos. Em razão disso, a cadeia produtiva tem se preparado para novos investimentos em produção, infraestrutura, serviços e tecnologias (Peixe BR, 2021).

Apesar da abundante biodiversidade de espécies aquáticas continentais, o país tem produzido apenas uma pequena fração de espécies nativas, sendo sua totalidade dominada por espécies exóticas como a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). Dentre as espécies nativas produzidas no país, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) ganha destaque pela alta aceitação de mercado e, conseqüentemente, pelo acréscimo positivo de exportação chegando a 648,6% no período de 2019/2020, segundo dados da Peixe BR (2021). Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piau (*Leporinus obtusidens*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e os bagres também são espécies nativas com grande visibilidade na produção brasileira. Embora essa categoria tenha reduzido sua participação em 3,2% no ano de 2020 comparado ao ano anterior, os peixes nativos têm um papel significativo na produção brasileira colaborando com 278.671 toneladas (Peixe BR, 2021). De acordo com a análise de dados da Peixe BR (2021), todos os estados brasileiros colaboram com a produção de espécies nativas (à exceção do Ceará), sendo este um ponto positivo para estimular ainda mais o setor.

Um dos grandes entraves para o crescimento da cadeia produtiva de espécies nativas é a deficiência de protocolos efetivos de reprodução e criação dos animais (Andrade & Yasui, 2003). Recentemente algumas espécies como o pirarucu (Vialle et al., 2018), tambaqui (Caetano et al., 2019) e surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*) [Zerlotini et al., 2019] apresentaram resultados preliminares do sequenciamento dos genomas. Sabe-se que a alta qualidade de células reprodutivas é um fator fundamental para assegurar descendentes

viáveis e garantir o sucesso da reprodução (Godinho, 2007; Andrade et al., 2015). Entretanto, a produção de gametas com alta qualidade é um fator limitante para muitas espécies de peixes mantidas em cativeiro, podendo ser amplamente variável e influenciada por diversos fatores endógenos e ambientais (Schreck et al., 2001; Papadaki et al., 2008; Bobe & Labbé, 2010). Dentre os efeitos negativos destacam-se o comprometimento do crescimento e desenvolvimento, afetando diretamente a produtividade dos animais em cativeiro (Bobe & Labbé, 2010).

Outra variável em sistemas fechados que pode afetar a produção dos gametas é a quantidade e qualidade da ração fornecida. A dieta dos animais interfere diretamente no funcionamento e na morfologia do fígado que tem forte envolvimento na formação do vitelo (metabolizando  $17\beta$ - estradiol em vitelogenina), havendo assim intermédio no sistema metabólico e no fornecimento de energia (Caballero et al., 2004), acometendo o desempenho reprodutivo e larval dos peixes (Izquierdo et al., 2001; Watanabe & Vassalo-Agius, 2003).

Além disso, o estresse causado no manejo dos reprodutores pode ser um fator de inibição dos hormônios reprodutivos (GnRH, *FSH*, *LH* entre outros) [Bromage, 1995; Bombardelli et al., 2009]. Na fase primária de estresse a liberação de adrenalina e principalmente o cortisol, acabam suprimindo o eixo reprodutivo, como observado em altas densidades de pirarucu (Brandão et al., 2006). Em algumas espécies, o aumento do cortisol e adrenocorticotropina (*ACTH*) no plasma sanguíneo após estresse crônico, diminui os níveis de testosterona plasmática e 11-cetotestosterona (*11KT*) [Aegerter et al., 2005; Wendelaar Bonga, 2011], prejudicando a performance reprodutiva dos animais.

Os fatores abióticos também afetam diretamente a produção dos gametas. Esses fatores podem ser utilizados como fonte de informação sobre o período reprodutivo e o tipo de desova da espécie. Animais de regiões tropicais e subtropicais possuem íntima relação com a precipitação, por exemplo, necessitando de períodos chuvosos para desencadear a produção de hormônios responsáveis pelo início da reprodução (Lowe-McConnel, 1975). Algumas espécies demonstram ainda que só há apresentação de ciclos

reprodutivos quando as condições do ambiente são favoráveis à sobrevivência da prole (Munro, 1990).

Outro exemplo é observado em espécies migradoras também conhecidas como espécies de piracema, além da alta afinidade com períodos de maior precipitação e temperatura, essas espécies apresentam desova total, garantindo o maior número de descendentes por ciclo, evitando perdas energéticas desnecessárias (Naumov, 1956; Ashan 1966; De Viaming, 1975; Sundararaj & Vasal, 1976). A piracema é um acontecimento biológico complexo que auxilia no desenvolvimento gonadal, maturação e desova dos animais. Nessa classificação comportamental conhecida como migração, se encontram espécies nativas brasileiras como o dourado (*Salminus brasiliensis*), pacu, curimatás (*Prochilodus lineatus*), tambaqui, entre outras (Leira et al., 2018). Na grande maioria das espécies amazônicas como o pirarucu, por exemplo, o período reprodutivo se inicia durante a estação chuvosa. É nesse momento que os casais se formam e migram para os locais inundados pelas cheias para realizarem a desova (Núñez & Duponchelle, 2009; Núñez et al., 2011).

### **1.1 Controle endócrino da reprodução em teleósteos**

O início do processo reprodutivo em peixes teleósteos ocorre a partir dos estímulos ambientais, como temperatura da água, fotoperíodo e pluviosidade, por exemplo. Essa estreita relação com fatores ambientais sustenta que a eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas ocorram em épocas favoráveis à sobrevivência da prole, sendo esses fatores suprimidos em eventual necessidade (condições desfavoráveis à reprodução) [Almeida, 2013].

É na base do diencéfalo que estão localizados o hipotálamo e a hipófise, atuantes dos principais centros que coordenam os episódios fisiológicos, especialmente neuroendócrinos (Iseki & Negrão, 2003). O aumento do fotoperíodo é interpretado pela glândula pineal que reduz a quantidade de melatonina e estimula a liberação da kisspeptina (*KISS*) [Baldisserotto, 2018]. A proteína *KISS* é responsável pelo início de uma cascata de alterações bioquímicas que induzirão a produção e liberação do hormônio liberador de

gonadotrofinas (*GnRH*) através do hipotálamo (Godinho, 2007; Baldisserotto, 2018; Chen et al., 2013).

Por sua vez, o *GnRH* é considerado o maior indutor da secreção das gonadotrofinas (*GtHs*) [Dufour et al., 2010]. Ele estimulará a adenohipófise na produção e liberação do hormônio folículo estimulante (*FSH* ou *GtH I*) e do hormônio luteinizante (*LH* ou *GtH II*), que por meio da corrente sanguínea chegarão até as gônadas e induzirão a produção dos hormônios esteroides (andrógenos, estrógenos e progestágenos). Através dessa cascata de hormônios ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (H-H-G) ocorrerá o controle da espermatogênese nos machos e da ovogênese nas fêmeas (Godinho, 2007; Baldisserotto, 2018; Chen et al., 2013).

Nos machos, o *FSH* atuará nas células de Sertoli, promovendo a proliferação das espermatogônias ( $2n$ ) por meio de sucessivas mitoses. Outra atribuição desse hormônio nessas células está ligada à regulação, como suporte estrutural, nutricional e regulatório (parácrino) [revisado por Hatef & Unniapan, 2019]. Enquanto o *LH* estimulará a produção de hormônios andrógenos por meio das células de Leydig, compreendendo ainda, o processo final da espermatogênese e espermiacção (Godinho, 2007; Baldisserotto, 2018; Chen et al., 2013; revisado por Hatef & Unniapan, 2019). Outra função já conhecida do *FSH* e *LH* é o estímulo que exercem sobre as células de Leydig, transformando o colesterol em pregnenolona, convertida posteriormente em  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha P$ ) que exerce função como substrato para a produção dos hormônios esteroides (Schulz & Nóbrega, 2011).

As células de Leydig e as células de Sertoli possuem papel essencial durante o ciclo reprodutivo dos machos. É nos testículos que essas células se dividem em dois compartimentos, o intersticial (Leydig) e o germinativo (Sertoli). As células de Leydig produzem andrógenos do tipo testosterona, 11-cetotestosterona e androstenodiona sob efeito do *LH* (Baldisserotto, 2018). Já a maturação testicular ocorre sob a influência do *FSH*, convertendo  $17\alpha$  hidroxiprogesterona ( $17\alpha P$ ) em testosterona. As células de Sertoli recebem o andrógeno 11-cetotestosterona das células de Leydig que estimulam a

produção de activina, essas, serão responsáveis por incitar a proliferação das espermátogônias (Nagahama, 1994; Yamada et al., 2002; Scott et al., 2010).

Nas fêmeas, o processo de formação dos ovócitos irá ocorrer dentro dos folículos ovarianos. Esses folículos irão se formar a partir do momento em que a célula germinal é circundada por uma camada de células foliculares, se rompendo durante o processo de ovulação. Dessa maneira, os ovócitos possuem uma camada de proteção denominada de córion ou envelope vitelínico, além disso, uma porção externa composta por duas camadas, a Granulosa (externa e mais fina) e a Teca (interna e mais espessa) [Baldisserotto, 2018].

A Granulosa é formada a partir do desenvolvimento das células foliculares ao mesmo tempo que as células tecais a partir das camadas externas de tecidos conjuntivos (sob espessamento da zona pelúcida) [Lucci et al., 2001; Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Honda et al., 2007; Baldisserotto, 2018]. Esses revestimentos no folículo são essenciais para a captação de nutrientes, produção de hormônios esteróides e excreção de metabólitos, pois o ovócito presente no interior é avascular e depende inteiramente das células circundantes (Lima-Verde et al., 2011).

A fase de crescimento primário do ovócito parece acontecer independentemente da estimulação direta do FSH e LH (Billard, 1992), entretanto, esses hormônios exercem papel fundamental na reprodução. O estímulo inicial responsável pelo crescimento do ovócito e desenvolvimento folicular vêm quase exclusivamente do *FSH*. Esse hormônio estimula a síntese da enzima aromatase através das células da granulosa, convertendo a testosterona (andrógeno) produzida pela célula da teca em  $17\beta$ -estradiol (estrógeno) ou podendo ainda se difundir nas células da granulosa em  $17\alpha$ 20 $\beta$ -P ( $17\alpha$ 20 $\beta$ -progesterona) [Baldisserotto, 2018]. Em resposta a esse impulso, o  $17\beta$ -estradiol estimulará a síntese hepática de vitelogenina que será liberada na corrente sanguínea e transportada até os ovários. Conseqüentemente, as vitelogeninas serão incorporadas aos ovócitos ocasionando um crescimento dos mesmos, essa é uma das principais etapas da ovogênese (Nagahama, 1994; Yamada et al., 2002; Bobe & Labbé, 2010).

Já o LH, age no folículo inibindo a aromatase e estimulando a síntese de  $20\beta$ HSD. Já na fase final de maturação, o LH irá estimular as células foliculares a produzirem o progestágeno  $\alpha$  e  $17\alpha 20\beta$  (Nagahama & Yamashita, 2008; Almeida, 2013). Chen & Ge (2012) demonstraram ainda que o LH poderia ser o responsável pela formação dos ovários em zebrafish, sugerindo que esse hormônio tenha outras funções além das já conhecidas.

Após o término da fase reprodutiva, tanto em machos como em fêmeas, os esteroides sexuais bem como o FSH e LH, retornam aos seus níveis basais, considerados em muitas espécies de teleósteos por valores quase nulos ou indetectáveis (Nagahama, 1994; Yamada et al., 2002; Scott et al., 2010; Baldisserotto, 2018).

## **1.2 Gametogênese em teleósteos**

A espermatogênese é o processo de formação do gameta masculino, onde uma célula germinativa diploide por meio do processo de mitose dá origem a duas células também diploides, denominadas de espermatogônia tipo A e espermatogônia tipo B, sendo essa a fase de multiplicação das células. A espermatogônia tipo B originará o espermatócito primário ( $2n$ ) que através de uma fase meiótica I se dividirá dando origem a duas células haploides, espermatócitos secundários. Outra fase celular (meiose II) acontecerá e dessa vez, quatro células haplóides serão formadas. Por fim, o processo de espermiogênese transformará através de mudanças morfológicas e fisiológicas espermatídes em espermatozoides. Esse complexo coordenado de transformação celular ocorre dentro dos túbulos seminíferos, sendo esse conhecimento prévio positivo para a avaliação qualitativa das células reprodutivas (Lo Nostro et al., 2003b; Nobrega et al., 2009; Schulz et al., 2010).

De maneira geral, testículos em repouso permitem a observação de espermatogônias primárias ( $2n$ ) isoladas, cistos de espermatogônias secundárias ( $2n$ ) e espermatócitos primários ( $2n$ ). Na maturação inicial é comum encontrar cistos de células germinativas em diferentes estádios de desenvolvimento (espermatogônias primárias e secundárias, bem como, espermatócitos primários e espermatídes ( $n$ )). Em estágio de maturação final,

observa-se o lúmen dos túbulos seminíferos carregados de espermatozoides (n). Além disso, há presença de espermatogônias secundárias e espermátocitos primários nas gônadas dos animais (Bazzoli, 2003).

O processo de ovogênese se inicia quando uma célula germinativa diploide ( $2n$ ) realiza um processo de mitose, formando duas células diploides iguais ( $2n$ ), chamadas de ovogônias. As ovogônias formadas darão origem a mais duas ovogônias cada, pelo mesmo processo. Ao término do período germinativo, metade das células formadas irão se transformar em ovócito I ( $2n$ ) em um período denominado de crescimento. Uma fase de meiose separa essa célula  $2n$  em duas células haplóides formando um ovócito II e um glóbulo polar, início do período de maturação. O ovócito II e o glóbulo polar realizarão a meiose II dando origem a duas células haplóides cada e, somente uma célula do ovócito II (caso seja fertilizada) se transformará em óvulo, as demais serão descartadas como corpúsculos polares (Lima-verde et al., 2011; Baldisserotto, 2018).

Em ovários imaturos jovens, observa-se ovogônias e ovócitos perinucleolares iniciais, distribuídos em lamelas. Em fase de repouso e com baixa vascularização gonadal, não há presença de ovócitos visíveis, entretanto, estudos microscópicos identificam ovócitos perinucleolares e lamelas ovulíferas existentes. A maior incidência de ovócitos vitelogênicos é observada na fase de maturação inicial, nesse estágio há células de diferentes tamanhos, perinucleolares e alvéolo-corticais. No entanto é no estágio de maturação final que as lamelas ovulíferas são preenchidas por grandes ovócitos nutridos de vitelo, sendo possível ainda visualizar ovócitos em fase de vitelogênese (Bazzoli, 2003).

### **1.3 Avaliação da qualidade dos gametas**

Nos últimos anos, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de identificar células reprodutivas viáveis. Aperfeiçoar nossa compreensão desses fatores requer investigações detalhadas sobre a espécie, incluindo suas informações genéticas que são a base biológica de cada indivíduo (Galo, 2013; Hilsdorf & Paiva, 2021). A propagação do conhecimento gerado, aliado ao

aperfeiçoamento da produção, poderia ser uma ferramenta eficaz para atividades de criação e repovoamento de espécies (Pereira et al., 2006; Godinho, 2007). Nesse sentido, pesquisas têm permitido associar a qualidade do gameta a fatores fisiológicos e morfológicos, promovendo adequação nos procedimentos de manejo (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

A avaliação micro e macroscópica dos espermatozoides e ovócitos compreendem etapas para um básico entendimento da reprodução das espécies (Bazzoli & Rizzo, 1990). Tradicionalmente nos machos, por exemplo, sob uso de microscopia óptica, a avaliação de motilidade, concentração e morfologia dos espermatozoides é usualmente utilizada para avaliar uma amostra de sêmen (Arruda et al., 2007; Galo et al., 2011).

O uso de sistemas computadorizados de análise de sêmen (CASA - computer assisted sperm analysis) tem permitido a obtenção de informações precisas e significativas da movimentação individual dos espermatozoides, bem como, superpopulações de células (Amann & Katz, 2004). A confiabilidade dessa técnica está intimamente relacionada com a rigorosa análise computadorizada realizada por um sistema de estroboscópio de alta precisão. Esse procedimento permite uma vídeomicrografia de monitoramento constante, onde cada imagem captada pela câmera acoplada é convertida em uma imagem digital que serão ordenadas e darão origem ao sequenciamento do movimento do espermatozoide (Donald et al., 1988; Farrel et al., 1996; Amann & Katz, 2004).

As avaliações das defesas antioxidantes também permitem verificar a qualidade do sêmen, já que o estresse oxidativo pode prejudicar a motilidade das células, a viabilidade e funcionalidade celular e a integridade do DNA (revisado por Felix et al., 2021). Nesse sentido, a avaliação da atividade de enzimas envolvidas no sistema antioxidante como catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase podem ser usados para verificar a qualidade do sêmen, assim como, o sistema antioxidantes não-enzimáticos (vitaminas E e C, glutathione e grupos tiol de proteínas).

O uso de sondas fluorescentes como o brometo de etídio (Halangk & Frank, 1984), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342)

[Casey et al., 1993; Maxwell et al., 1997], SYBR-14 (Thomas et al., 1998; Garner et al., 1999), diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) [Harrison & Vickers, 1990; Valcárcel et al., 1994; Peña et al., 1998; Souza, 2001] e iodeto de propídio (PI) também permitem a avaliação da qualidade dos gametas masculinos (Arruda et al., 2007). Essas análises são capazes de avaliar a integridade da membrana plasmática e do DNA, visto que, injúrias nessas estruturas poderiam facilmente interromper sua funcionalidade (Celeghini, 2005; Arruda et al., 2007).

Em ovócitos, as avaliações mais comuns são as estimativas de fertilização, eclosão e de larvas normais, podendo ainda quantificar o número total de ovócitos produzidos (Pires et al., 2018). Além disso, um coeficiente positivo na avaliação é o aumento do diâmetro total do ovócito, indicando condições favoráveis na quantidade de reserva energética e, conseqüentemente, na sobrevivência das larvas (Bonislawska et al., 2001; Felizardo et al., 2012).

Estudos com surubins-da-paraíba (*Steindachneridion parahybae*) demonstram que a imersão dos ovócitos em uma solução de azul de trypan na concentração de 0,2 a 0,4% durante 3 a 5 minutos, permite a identificação de ovócitos de má qualidade, já que os mesmos ficam permeáveis ao corante (Sanches et al., 2012; Godoy et al., 2013). De forma geral, há poucas técnicas para avaliar a qualidade dos gametas femininos.

Recentemente, as pesquisas na área de biologia molecular aplicadas à reprodução se tornaram promissoras. Resultados satisfatórios demonstram a possibilidade de utilizar o perfil de mRNA como preditor da capacidade de fertilização de células reprodutivas em peixes (Guerra et al., 2013). A importância expressiva da célula reprodutiva feminina já era bem conhecida, apesar disso, o acúmulo de material genético até então “residual” no espermatozoide era questionado (Guerra et al., 2013; Bobé, 2015; Reading et al., 2018). Entretanto, a recente constatação da contribuição dessa célula masculina para a fertilização e o desenvolvimento embrionário levantou grandes expectativas para os pesquisadores, sendo o mRNA presente um possível método avaliativo de qualidade dos gametas femininos e masculinos.

Os transcritos estão sendo considerados marcadores importantes, pois seu nível de expressão tem sido utilizado como preditor do potencial sucesso da desova (Guerra et al., 2013; Reading et al., 2018).

O avanço das ferramentas moleculares na reprodução de peixes permitiu investigar uma ampla variedade de transcritos em óvulos e espermatozoides que parecem ser essenciais para a fertilização e desenvolvimento bem-sucedido do embrião. Sendo assim, o perfil de mRNAs encontrados nos gametas femininos e masculinos geraram grandes expectativas de seu potencial como biomarcador molecular de qualidade dessas células reprodutivas (Traverso et al., 2012; Jodar et al., 2013). Dessa forma, este trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre o uso de transcritos paternos e maternos como indicadores da qualidade de gametas em teleósteos.

## 2 REVISÃO

### **RNAs mensageiros (mRNAs) como indicadores da qualidade de gametas em peixes**

*Messenger RNAs as indicators of gamete quality in fish*

**Lazarotto, M.<sup>1</sup>, Kuradomi, R.F.<sup>2</sup>, Lanes, C.F.C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, AM, Brasil.

Correspondência: carloslanes@unipampa.edu.br

#### **Resumo**

A necessidade de se obter informações prévias sobre a viabilidade de sêmen e ovócitos e, conseqüentemente, evitar gastos desnecessários com reprodutores têm aumentado a busca por métodos mais eficazes para determinar a qualidade dos gametas em peixes. Nos últimos anos, o emprego das novas tecnologias de sequenciamento tem permitido identificar a presença específica de uma ampla variedade de transcritos em óvulos e espermatozoides. Esses transcritos que se acumulam durante os processos de espermatogênese e ovogênese parecem ser essenciais para o sucesso da fertilização e, conseqüentemente, para o desenvolvimento bem-sucedido do embrião. Neste sentido, essa revisão tem por finalidade abordar como ocorre o acúmulo desses transcritos durante a gametogênese e o uso dos mesmos como indicadores da qualidade de gametas em teleósteos. A identificação de um “pool” de transcritos que estejam diretamente ligados à qualidade de gametas e, conseqüentemente, com o sucesso na viabilidade de embriões deverá ser um método interessante para a escolha dos melhores reprodutores para serem utilizados durante o processo de reprodução em cativeiro.

**Palavras-chave:** espermatozoides, ovócitos, reprodução, transcritos, transcriptoma.

#### **Abstract**

*The need to obtain prior information on semen and oocyte viability and, consequently, avoid unnecessary expenses with broodstock has increased the search for more effective methods to determine gamete quality in fish. In recent years, the use of new sequencing technologies has allowed the identification of the specific presence of a wide variety of transcripts in eggs and spermatozoa. These transcripts that accumulate during the processes of spermatogenesis and oogenesis seem to be essential for the success of fertilization and, consequently, for the successful development of the embryo. In this sense, this review aims to address how the accumulation of these transcripts occurs during the process of gametogenesis, and the use of these transcripts as indicators of gamete quality in teleosts. The identification of a pool of transcripts that are directly associated to gamete quality and, consequently, with successful embryo viability should be an interesting method for choosing the best broodstock to be used during the reproduction process in captivity.*

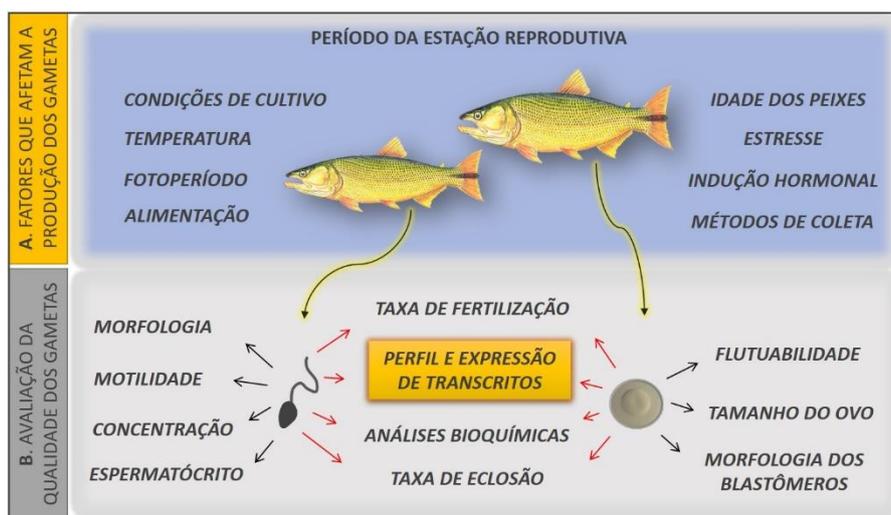
**Keywords:** spermatozooids, oocytes, reproduction, transcripts, transcriptome.

#### **Introdução**

A qualidade de um gameta pode ser definida como sua capacidade de fertilizar ou ser fertilizado e, posteriormente, gerar uma prole viável (Bobe & Labbé, 2010). A qualidade dos gametas produzidos pelos peixes mantidos em cativeiro, ainda, é altamente variável e tem sido considerado um dos principais problemas para expansão da piscicultura (Bobe & Labbé, 2010; Migaud et al., 2013). Basicamente,

práticas ótimas de manejo dos reprodutores baseadas no conhecimento das exigências nutricionais e dos fatores ambientais são essenciais para a produção de gametas de alta qualidade em cativeiro. Entretanto, para a grande maioria das espécies cultiváveis as exigências mínimas ainda não são conhecidas (Migaud et al., 2013). Os principais fatores que afetam os reprodutores durante a produção de gametas foram intensamente revisados por Bobé & Labbé (2010), Valdebenito et al. (2013) e Migaud et al. (2013) e estão resumidos na Fig.1.

O uso de gametas de boa qualidade é importante para a produção de larvas viáveis, entretanto, a avaliação dos gametas é um processo difícil de ser realizado (Kjorsvik et al., 1990; Bobé & Labbé, 2010). As técnicas usadas para avaliar a qualidade dos gametas femininos e masculinos em peixes são baseadas principalmente nas análises morfológicas (Fig. 1). Por outro lado, as estimativas morfológicas não explicam os fatores intrínsecos relacionados à qualidade de gametas. Dessa forma, nos últimos anos as pesquisas têm se intensificado para uma melhor compreensão de como os mecanismos celulares e moleculares estão relacionados com a produção de gametas de boa qualidade (Bobé & Labbé, 2010; Lubzens et al., 2016; Robles et al., 2017). O completo entendimento desses mecanismos é de extrema importância para a indústria da aquicultura a fim de evitar gastos com a manutenção de um grande número de reprodutores e, conseqüentemente, diminuir os custos com desovas que podem gerar larvas com altas taxas de deformidades e baixas taxas de crescimento.



**Figura 1.** Principais fatores que afetam os reprodutores durante a produção de gametas (A) e os principais parâmetros que podem ser utilizados para determinar a qualidade dos gametas em peixes (B).

Nos últimos anos, as informações genéticas para espécies de interesse comercial para a aquicultura têm aumentado notavelmente, principalmente, após o surgimento das novas plataformas de sequenciamento (Kumar & Kocour, 2017). Com base no uso dessas novas tecnologias já se conhece o genoma de, pelo menos 80 espécies de peixes, incluindo importantes espécies para aquicultura como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e o linguado (*Cynoglossus semilaevis*) (www.ensembl.org). Além disso, as novas plataformas de sequenciamento têm permitido a execução de estudos transcriptômicos em diferentes áreas da aquicultura (Qian et al., 2014). O transcriptoma se refere ao completo conjunto de transcritos em uma célula, tecido ou organismo específico para um determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica (Wang et al., 2009).

Na área de reprodução, as novas tecnologias de sequenciamento têm permitido investigar as vias moleculares envolvidas durante a ovogênese e a espermatogênese em peixes. Além disso, pesquisas têm identificado a presença específica de uma ampla variedade de transcritos em óvulos e espermatozoides. Esses transcritos encontrados em ambos os gametas parecem ser essenciais para a fertilização e o desenvolvimento bem-sucedido do embrião (Traverso et al., 2012; Jodar et al., 2013). Nesse contexto, o perfil de RNAs encontrados em gametas femininos e masculinos parece ter um grande potencial para serem utilizados como biomarcadores da qualidade de gametas.

Métodos de sequenciamento e análises genéticas, embora sejam mais custosas comparadas com observações morfológicas, podem fornecer informações precoces valiosas sobre a qualidade dos gametas. Essas descobertas, embora recentes, têm grande impacto na aquicultura (Herráez et al., 2016). Apesar das funções exatas dos RNAs não serem bem conhecidas, a descoberta de sua atividade ligada ao sucesso da fertilização pode tornar o seu conteúdo um potencial indicador de qualidade de gametas, tanto em animais quanto em humanos (Nishimura & Dode, 2014). Dessa forma, essa revisão bibliográfica tem o propósito de abordar o uso de transcritos paternos e maternos como indicadores da qualidade de gametas em teleósteos.

### **Presença e acúmulo de RNAs nos espermatozoides**

Os teleósteos em sua maioria possuem um par de testículos compostos por numerosos lóbulos separados por um tecido conjuntivo, armazenando uma grande quantidade de cistos. Em cada cisto são encontradas células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento, essas darão origem aos espermatozoides (Baldisserotto, 2018). Esse processo é conhecido como espermatogênese, nele, há uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas ocorrendo. Essas mudanças, irão transformar a espermatogônia diplóide inicial em uma célula haplóide e móvel, capaz de transferir toda a informação genética necessária para o óvulo. É através de uma sequência de transformações mitóticas e meióticas que as espermatogônias irão se transformar em espermátocitos (estágios primário e secundário) e espermátides que por fim passarão pelo processo de espermiogênese, se tornando então a célula reprodutiva masculina, o espermatozoide (Herráez et al., 2016). Além disso, os testículos possuem células de Sertoli responsáveis pelo metabolismo nutricional das células germinativas e células de Leydig com produção de hormônios esteroides que estimulam a gametogênese e o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários. Após a produção nos testículos, os espermatozoides maduros são encaminhados para o lúmen central e seguem para o ducto espermático, onde posteriormente serão liberados pela abertura urogenital (Baldisserotto, 2018).

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e transcricionalmente inativas caracterizadas por um compacto núcleo haplóide e um pequeno citoplasma (revisado por Jodar et al., 2013). Cada célula possui um sistema impulsor, para mobilizar o núcleo, conhecido como flagelo, esses são formados durante a espermatogênese, período no qual o DNA é amplamente compactado no núcleo e o material remanescente é descartado no corpo residual (Schulz et al., 2010). Na maioria das espécies de peixes os espermatozoides não possuem acrossoma e o contato do gameta masculino com a membrana do ovócito ocorre através de uma abertura denominada de micrópila (Jamieson, 1991). Além disso, certas espécies de fecundação externa apresentam espermatozoides inativos, ou seja, sua mobilidade inicia-se quando fatores químicos são alterados (Baldisserotto, 2018).

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o espermatozoide fosse apenas uma célula que transportava o genoma masculino para o ovócito e que fosse incapaz de sintetizar proteínas e RNAs. Especulava-se que o mRNA encontrado nos espermatozoides seria um material residual de outras células presentes no ejaculado, proveniente de resquícios de citoplasma não absorvidos pelas células de Sertoli ou mRNA mitocondrial, e que, não teria função alguma (Miller et al., 2005). Entretanto, estudos mais recentes comprovam que os espermatozoides contêm uma série de RNAs que, no momento da fecundação, são inseridos no ovócito, juntamente com os centríolos e fatores de ativação. Destes, muitos permanecem estáveis até a ativação do genoma embrionário (Boerke et al., 2007). Até o momento, sabe-se que os RNAs presentes nos espermatozoides devem afetar o sucesso da fertilização, o desenvolvimento

inicial do embrião e podem modificar epigeneticamente o fenótipo da progênie (revisado por Jodar et al., 2013). Além disso, dados recentes sugerem que a presença de RNA nos espermatozoides seja uma permanência seletiva de certos transcritos (Miller et al., 2005; Johnson et al., 2011; Hamatani, 2012; Hosken & Hodgson, 2014).

Um fator já conhecido é o centro de armazenamento citoplasmático de RNA altamente especializado e responsável pelo sucesso da espermatogênese que desempenha um importante papel na via reprodutiva (Nagamori & Sassone-Corsi, 2008). Esse centro conhecido como corpo cromatóide compreende fatores específicos das células germinativas masculinas. Uma particularidade dos peixes é a apresentação organizacional da cromatina espermática, envolvendo uma complexidade de proteínas básicas nucleares (SNBPs) [Herráez et al., 2016]. Estudos demonstram que durante a espermatogênese a cromatina é processada e empacotada e a transcrição interrompida, deixando um conjunto de RNAs no citoplasma do espermatozoide maduro (Peruquetti et al., 2010; Herráez et al., 2016). Além de funcionar como coordenador subcelular de vias de processamento de RNAs, outra função realizada por esse complexo macromolecular é a atividade intracitoplasmática, se movendo ao redor do núcleo realizando contato direto com o poro nuclear, uma performance interessante do ponto de vista biológico (Soderstrom & Parvinem, 1976; Kotaja, 2006).

O armazenamento dos mRNAs é um fator determinante para evitar a degradação, visto que certos mRNAs são essenciais para a fertilidade e o sucesso inicial do desenvolvimento do embrião (Gilbert et al., 2007; García-Herrero et al., 2011). Apesar da via pela qual os mRNAs são direcionados a esse centro seja ainda pouco conhecida, a importância do corpo cromatóide durante a reprodução é evidenciada durante o processo de espermatogênese, visto que mutações em alguns componentes do corpo cromatóide, como a proteína TDR1/ MTR-1 e o antígeno de histocompatibilidade OX3, induziram o fenótipo infértil nos machos de camundongos (Head & Kresge, 1985; Chuma et al., 2006), sendo também demonstrados em muitos ratos *knockout* que não integram esses centros às células reprodutivas (Meikar et al., 2014).

Embora a maioria das pesquisas tenham sido realizadas em mamíferos, há descrições recentes em espermátocitos de tilápia (*Tilapia rendalli*) [Peruquetti et al., 2010] e espermátides de medaka (*Oryzias latipes*) [Yuan et al., 2014]. Peruquetti e colaboradores (2010) compararam a distribuição do material nucleolar com a formação do corpo cromatóide no processo de espermatogênese em tilápias. Esse estudo permitiu a observação de um material ribonucleoprotéico análogo ao constituinte celular que se movimenta do núcleo para o citoplasma e desempenha função importante na formação do corpo cromatóide. Esta movimentação celular foi observada próxima ao complexo sinaptonemal dos espermátocitos primários, sugerindo que esse material ribonucleoprotéico poderia estar relacionado com o RNA que será traduzido durante a espermatogênese. Essa atuação do corpo cromatóide é uma função muito importante visto que a transcrição do RNA ocorre nas espermátides iniciais, mas a tradução da proteína é fundamental até as últimas fases da espermiogênese (Monesi, 1965; Peruquetti et al., 2010). Outro estudo realizado por Yuan e colaboradores (2014) demonstrou a análise do plasma germinativo através de técnicas de imunofluorescência e microscopia eletrônica, utilizando o gene *vasa* como marcador em células germinativas masculinas de medaka. Essa pesquisa revelou pela primeira vez a presença do gene *vasa* como componente do corpo cromatóide em medaka, sendo assim, possui um importante papel nas células germinativas mitóticas, meióticas e pós-meióticas masculinas se mostrando ainda relevante na distribuição subcelular durante os processos de espermatogênese e espermiogênese. A descoberta do *vasa* como componente integral de plasma germinativo e corpo cromatóide além de sugerir uma relevante função na citodiferenciação pós-meiótica, mostra ainda que essa proteína desempenha papel importante na formação do flagelo.

As células germinativas masculinas expressam diferentes tipos de RNAs que se diferenciam entre si por meio das condições pré-existentes. Dentre essas classes, há os pequenos RNAs não codificantes de proteínas representados por micro-RNAs (miRNAs) e RNAs interferentes curtos (siRNAs), sendo esses responsáveis por controlar a tradução e a degradação do mRNA e, os piwi de interação (piRNAs), importantes na defesa do genoma, além disso, potenciais intermediadores da herança

epigenética (Valencia-Sanchez et al., 2006; Meikar et al., 2011; Yadav & Kotaja, 2014). Ocorrem também os RNAs não codificantes de cadeia longa (lncRNAs) que são capazes de estimular a metilação do DNA, remodelação da cromatina ou até mesmo inibir a ação dos miRNAs (Kung et al., 2013). Sob a mesma perspectiva e com grande potencial recém descoberto, os mRNAs estão relacionados com a embriogênese, morfogênese e implantação, além disso, são capazes de traduzir proteínas ligadas com as respostas geradas pelo estresse (Boerke et al., 2007). O papel exato dos RNAs permanece ainda pouco conhecido, entretanto, sabe-se que indivíduos de boa e má qualidade possuem quantidades de transcritos diferentes, sugerindo que a presença desses transcritos potencialmente relevantes poderia ter uma eficiência clínica interessante para avaliar a qualidade de uma amostra de sêmen (Lalancette et al., 2008).

### **RNAs mensageiros (mRNA) como indicadores da qualidade do sêmen**

Os estudos investigando a presença de transcritos nos espermatozoides têm sido realizados, principalmente, em humanos, roedores, e bovinos (Dadoune et al., 2005; Gilbert et al., 2007; Fang et al., 2014). Em 2002, Ostermeier e colaboradores sugeriram que o espermatozoide humano continha de 3.000 a 7.000 transcritos que codificam proteínas. Essa pesquisa gerou perspectivas interessantes na área da reprodução humana e animal para o uso de transcritos como biomarcadores de fertilidade. Na área da reprodução humana, análises de microarranjos têm permitido a identificação de perfis de mRNA diferenciado entre pacientes inférteis e férteis (Jodar et al., 2012). Isso tem levado a identificação de vias específicas que causam a infertilidade em humanos (Jodar et al., 2013). Em bovinos, a comparação do transcriptoma de espermatozoides obtidos de animais de alta e baixa fertilidade também mostrou diferenças no perfil de transcritos entre os dois grupos, sugerindo que há transcritos relacionados com a fertilização (Bissonnette et al., 2009; Feugang et al., 2010). Em peixes, há pouca informação sobre a presença de transcritos nos espermatozoides. A maioria dos estudos transcriptômicos realizados com machos na área da reprodução de peixes tem sido apenas descritivos e podem ser incluídos em 3 categorias: (i) espermatogênese e desenvolvimento testicular; (ii) avaliação de hormônios, drogas e contaminantes sobre a espermatogênese e o desenvolvimento dos testículos e mais recentemente (iii) o estudo de transcritos como indicadores de qualidade de sêmen (revisado por Cabrita et al., 2014).

Em 2013, Guerra e colaboradores compararam a expressão de 11 transcritos através de PCR em tempo real (qPCR) entre reprodutores que produzem sêmen de boa e má qualidade na dourada (*Sparus aurata*) e no zebrafish (*Danio rerio*). Os 11 transcritos estudados foram: *bdnf* (fator neurotrófico), *hspa8* (proteína do choque térmico), *acvr1l1* (receptor de ativina A tipo II), *lhcg* (hormônio luteinizante/receptor de coriogonadotrofina), *lepa* (leptina), *bik* (silenciador que interage com BCL2/ indutor de apoptose), *dmrt1* (fator de transcrição 1 e mab-3), *fshb* (FSH polipeptídeo beta), *hsd17b4* (17 beta-hidrosisteróide desidrogenase 4), *kita* (kit receptor a) e *myca* (oncogene mielocitomatose a). Em zebrafish, um maior nível de expressão dos genes *bdnf*, *lhcg*, *lepa*, *dmrt1* e *fshb* foi verificado em machos com um sêmen de boa qualidade, por outro lado, *bik* e *hsd17b4* foram mais abundantes em reprodutores que produzem sêmen de má qualidade (Tab. 1). Na dourada, machos que apresentaram sêmen com baixa motilidade mostraram também um nível baixo de expressão dos genes *bdnf*, *bik* e *kita* (Guerra et al., 2013). Recentemente, Riesco et al., (2019) demonstraram que machos de zebrafish que produzem sêmen de baixa qualidade expressam baixos níveis dos genes *kita* e *dmrt1* e isso tem uma relação direta com a sobrevivência dos embriões.

Embora esses estudos tenham mostrado uma diferença na expressão de alguns genes entre machos que produzem sêmen com qualidade diferente, na área da aquicultura esses estudos ainda são raros. Os estudos mais recentes na área da reprodução relacionando o nível de expressão de determinados genes com qualidade de sêmen tem sido direcionado para a área da nutrição de reprodutores e para área da criopreservação de sêmen.

Em 2015, Valcarce e colaboradores verificaram um maior nível de expressão dos genes *epa*, *dmrt1* e *bdnf* nos testículos de reprodutores de zebrafish suplementados com uma dieta contendo probióticos. Porém, nesse estudo a qualidade do sêmen dos animais não foi avaliada. Em outro estudo realizado com a enguia europeia (*Anguilla anguilla*), a expressão dos genes *activin*, *ara*, *arb*, *pr1*, e *fshr*

foram associados com a maior produção de sêmen e a maior motilidade em reprodutores que foram suplementados com uma dieta contendo probiótico após duas semanas de experimento (Vilchez et al., 2015).

Na área da criopreservação de espermatozoides, alguns estudos têm demonstrado a diminuição ou até mesmo a eliminação de alguns transcritos após a criopreservação (Carton-Garcia et al., 2013; Riesco & Robles 2013; González-Rojo et al. 2014; Herráez et al. 2017). Esse efeito sobre a transcrição de determinados genes é um ponto extremamente relevante já que isso pode ter um efeito direto sobre a fertilização e, conseqüentemente, sobre o desenvolvimento dos embriões. Além disso, já foi demonstrado que células com danos de DNA após o processo de criopreservação altera a expressão de genes em embriões e larvas, indicando que a qualidade do sêmen reflete no perfil transcriptômico das larvas (Pérez-Cerezales et al., 2011). Sendo assim, a avaliação do perfil de transcritos após o processo de criopreservação das células espermáticas poderia ser uma excelente ferramenta para selecionar os protocolos mais apropriados e seguros para a criopreservação de espermatozoides em teleósteos (Cabrita et al., 2014; Figueroa et al., 2020).

**Tabela 1.** Transcritos paternos relacionados à qualidade de gametas em teleósteos.

<b>Espécie</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Função</b>	<b>Expressão em gametas de boa qualidade</b>	<b>Abreviação do gene</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Danio rerio</i></b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro	Atua na manutenção dos neurônios	Alta	<i>bdnf</i>	Guerra et al., 2013
	Receptor de hormônio luteinizante / coriogonadotrofina	Envolvido no processo de gametogênese	Alta	<i>lhcg</i>	
	Leptina	Controla o apetite, reduz a ingestão de alimentos e regula o gasto energético.	Alta	<i>lepa</i>	
	Fator de transcrição 1 relacionado ao Doublesex e ao mab-3	Atua na determinação e diferenciação do sexo masculino, controlando o desenvolvimento do testículo e a proliferação das células germinativas masculinas.	Alta	<i>dmrt1</i>	
	Hormônio folículo estimulante subunidade beta	Atua na gametogênese.	Alta	<i>fshb</i>	

	Matador que interage com Bcl-2	Atua no processo de apoptose.	Baixa	<i>bik</i>	
	17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase	Atua na via de beta-oxidação peroxissomal para ácidos graxos.	Baixa	<i>hsd17b4</i>	
<i>Sparus aurata</i>	Fator neurotrófico derivado do cérebro	Atua na manutenção dos neurônios	Alta	<i>bdnf</i>	Guerra et al., 2013
	Matador que interage com Bcl-2	Atua no processo de apoptose.	Alta	<i>bik</i>	
	Kit receptor A	Atua na integridade do DNA do espermatozoide.	Alta	<i>kita</i>	
<i>Anguilla anguilla</i>	Activina	Controla a proliferação e a diferenciação celular.	Alta	<i>activin</i>	Vilchez et al., 2015
	Receptor de andrógeno subtipo $\alpha$	Atua na espermatogênese.	Alta	<i>ara</i>	
	Receptor de andrógeno subtipo $\beta$	Atua na espermatogênese.	Alta	<i>ar<math>\beta</math></i>	
	Receptor do hormônio folículo estimulante	Atua na gametogênese.	Alta	<i>fshr</i>	
	Receptor da progesterona	Auxilia na meiose, espermiogênese e hidratação dos espermatozoides.	Alta	<i>prl</i>	

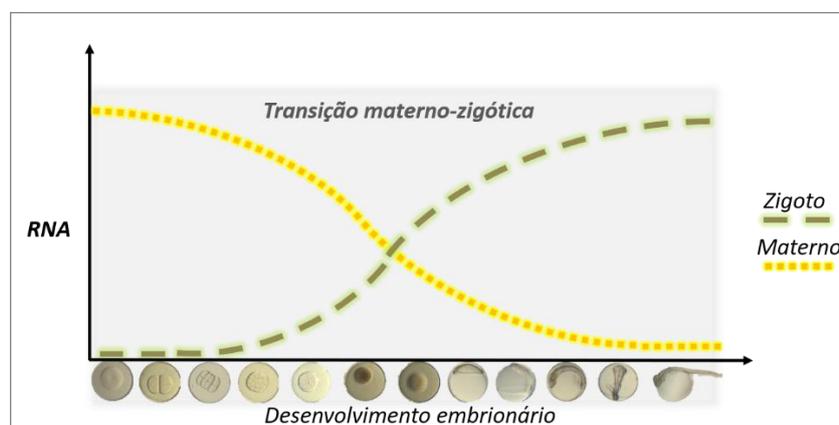
#### Acúmulo de transcritos maternos e o controle do desenvolvimento embrionário

Na maioria dos teleósteos, o ovário é um órgão par que se estende em sentido crânio-caudal e funde-se na região terminal, formando um ducto ovocitário comum. Esse órgão é revestido pela túnica albugínea que expõe septos para o seu interior, originando lamelas ovulíferas que delimitam o parênquima da cavidade ovariana central. É nessas lamelas que se encontram ovogônias e ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (Bazzoli, 2003). As células responsáveis pelo envolvimento dos ovócitos são os folículos ovarianos, formados no término do processo de foliculogênese (Grier et al., 2009; Radael et al., 2016). O desenvolvimento do ovócito que ocorre dentro desse complexo folicular, compreende os estádios de crescimento primário e secundário, maturação e ovulação (Grier et al., 2009). As atividades primárias e secundárias são conhecidas como estádios pré-vitelogênico e vitelogênico, respectivamente (Tyler & Sumpter, 1996; Patiño & Sullivan, 2002; Grier et al., 2009). Durante o período pré-vitelogênico os ovócitos começam a acumular lipídios neutros, além disso, uma grande quantidade de RNAs e transcrições genéticas maternas acumulam-se no citoplasma. Essas informações são essenciais para direcionar o desenvolvimento embrionário precoce logo após a fertilização (Reading et al., 2018). No período vitelogênico, os ovócitos acumulam lipoproteínas ricas em fosfolipídios que serão armazenadas e utilizadas na formação do vitelo. Ao término desses estádios, o ovário estará preenchido com os ovócitos ricos em nutrientes que posteriormente sofrerão maturação e ovulação (Reading et al., 2018).

Os ovócitos maduros são células altamente qualificadas que armazenam o material necessário para o começo do crescimento e desenvolvimento embrionário (Rothschild et al., 2003). Diferentemente dos espermatozoides, não possuem movimento próprio e são consideravelmente maiores que as células masculinas (Amabis & Martho, 1997). O tamanho desigual entre as células germinativas transcorre pelo fato de os ovócitos armazenarem grânulos e substâncias nutritivas que constituirão o vitelo e suprirão as necessidades básicas do embrião (Rothschild et al., 2003). Esses nutrientes maternos são compostos basicamente de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais e íons essenciais que serão transportados do fígado para os folículos ovarianos por meio de lipoproteínas. A constituição adequada do vitelo é um fator importante na qualidade do ovo, visto que a maioria dos peixes é ovípara e dependem inteiramente desse sustento nutricional materno. Embora os fatores extrínsecos como a dieta dos reprodutores, criação e o estresse sofrido pelos animais possam interferir na qualidade do ovócito, as atividades moleculares são fatores de extrema relevância para o sucesso da fertilização e o desenvolvimento dos embriões (Reading et al., 2018).

As fases iniciais do desenvolvimento embrionário são controladas por fatores maternos, os quais são depositados no ovócito durante a ovogênese. Dessa forma, ovócitos de vertebrados contêm DNA e RNA polimerases, histonas, fatores de transcrição e tradução, RNAs ribossomais (RNAr), RNAs de transferência (RNAt) e RNAs mensageiros (Tata, 1986). Na fertilização, os fatores maternos tornam-se disponíveis e suportam todas as funções celulares básicas, incluindo: o metabolismo celular, as divisões celulares e nucleares, a adesão intercelular, assim como, o estabelecimento do eixo do corpo e a especificação das células embrionárias até a ativação da transcrição zigótica (revisado por Pelegri, 2003). Além disso, transcritos maternos devem também funcionar como fonte de nutrição, fornecendo nucleotídeos e fósforo para o desenvolvimento do embrião (Shen-Orr et al., 2010; Vesterlund et al., 2011).

O início da ativação dos genes zigóticos ou ativação do genoma embrionário normalmente ocorre durante a transição materno-zigótica (TMZ). Durante essa fase, a importância dos transcritos maternos gradualmente diminui e os genes zigóticos tornam-se os fatores primários controlando o desenvolvimento (Fig. 2). No zebrafish, TMZ ocorre gradualmente, iniciando no ciclo celular 9-10 (512-1.000 células) e finalizando no ciclo celular 12 (Pelegri, 2003). Entretanto, Mathavan et al. (2005) demonstraram que a ativação de alguns genes zigóticos inicia antes do início da TMZ em zebrafish. A expressão desses genes aumenta a partir do estágio de 64-128 células e a maioria deles está envolvida no crescimento celular, proliferação celular, adesão celular e a estabilidade e síntese de RNAs. As proteínas codificadas por esses genes parecem ser necessárias previamente a TMZ para facilitar a transição durante essa fase e, conseqüentemente, promover o correto desenvolvimento embrionário.



**Figura 2.** Representação dos níveis de transcritos maternos e zigóticos durante o desenvolvimento embrionário de peixes. Transição materno-zigótica é o período em que os transcritos zigóticos são ativados e os transcritos maternos são degradados.

A degradação dos transcritos maternos é essencial para o desenvolvimento, já que muitos transcritos maternos codificam proteínas exigidas para o estabelecimento da polaridade do embrião e a continuidade da expressão desses genes poderia prejudicar o desenvolvimento normal do embrião. Assim, transcritos maternos precisam ser degradados seletivamente e esse processo é realizado por fatores zigóticos que reconhecem e degradam transcritos maternos específicos (revisado por Farley & Ryder, 2008). No zebrafish, o micro-RNA miR-430 tem sido considerado o principal fator na degradação de transcritos maternos durante o desenvolvimento embrionário (Giraldez et al., 2006; Liu et al., 2020).

No zebrafish, a degradação de transcritos maternos ocorre gradualmente durante o desenvolvimento embrionário. Mathavan et al. (2005) mostraram que 622 transcritos maternos foram agrupados em três diferentes grupos conforme o padrão de degradação. No primeiro grupo, composto por 221 genes, os transcritos maternos foram degradados antes do início do estágio de blástula. O segundo grupo (259 genes) foram degradados após o estágio de blástula. No último grupo (142 genes), os transcritos foram degradados gradualmente ao longo do desenvolvimento embrionário e persistiram até o estágio de segmentação. Esses resultados demonstram que os transcritos depositados durante a ovogênese não são degradados na mesma taxa e há uma degradação diferencial gene-específica. Além disso, esses resultados demonstram que os transcritos maternos estão relacionados com a fase final do desenvolvimento embrionário e podem estar associados com a qualidade das larvas recém-eclodidas.

#### **Transcritos maternos como indicadores da qualidade de ovócitos e embriões**

Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado que determinados transcritos maternos estão relacionados com a qualidade dos gametas femininos em algumas espécies de peixes. Os primeiros estudos investigando a importância de transcritos maternos e relacionando com a qualidade de ovos foram realizados com truta arco-íris (Aegerter et al., 2004; Aegerter et al., 2005). Nesses estudos iniciais com truta foi observado que a qualidade dos ovos diminui devido ao envelhecimento pós-ovulatório e esse fato foi acompanhado pela diminuição da expressão dos genes *igf-1*, *igf-2*, *igfr 1b*, *npm2*, e *tubb* e pelo aumento no nível da expressão dos genes *ctsz*, *cycB*, *krt8*, *krt18* e *ptgs2* (Aegerter et al., 2004; Aegerter et al., 2005). A positiva correlação dos transcritos maternos codificando para os genes *igf-1*, *igf-2* e *igfr* com a sobrevivência dos embriões fornece indícios que o eixo somatotrópico é essencial para o início do desenvolvimento dos embriões (Besseau et al., 2013). Bouleau e colaboradores (2014) demonstraram que a nucleoplasmina (*npm2*) é essencial para o desenvolvimento inicial do zebrafish, corroborando com os resultados encontrados por Aegerter et al. (2005) em truta arco-íris. Em 2007, Bonnet e colaboradores demonstraram que altos níveis de expressão de proibirina 2, um gene que parece estar envolvido com o ciclo celular e senescência, foram negativamente correlacionados com o desenvolvimento do embrião em truta arco-íris.

Em estudos com bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*), o perfil de transcritos envolvidos em apoptose, no estresse oxidativo, na imunidade e no estresse foram avaliados por RT-PCR em desovas obtidas de reprodutores selvagens e reprodutores mantidos em cativeiro (Lanes et al., 2012). Em geral, as desovas obtidas dos reprodutores mantidos em cativeiro apresentaram menores taxas de fertilização e eclosão. Dentre os 11 genes avaliados, somente o gene *gsh-px* foi mais expresso em ovos recém-fertilizados obtidos de reprodutores selvagens, enquanto o nível de expressão do gene *hsp70* foi mais elevado em ovos obtidos de reprodutores mantidos em cativeiro. Em outro estudo realizado com o bacalhau-do-Atlântico, Lanes et al. (2013), usando a plataforma de sequenciamento 454, identificaram 238 transcritos maternos diferencialmente expressos entre desovas obtidas de dois grupos de reprodutores (selvagens x cativeiro). Particularmente, transcritos envolvidos no metabolismo de frutose, ácidos graxos, glicerofosfolípídeos e fosforilação oxidativa foram diferencialmente expressos, mostrando potencial para serem usados como biomarcadores da qualidade dos gametas femininos. Rise et al. (2014) identificaram 3 transcritos (*dcbld1*, *ddc* e *acy3*) com um alto nível de expressão em ovos de baixa qualidade no bacalhau-

do-Atlântico, enquanto o nível de expressão dos genes *kpna7* e *hacd1* foi maior em ovos de alta qualidade.

No Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), Mommens et al. (2014) identificaram 20 genes diferencialmente expressos entre desovas de boa e má qualidade em embriões no estágio de 8 células utilizando a técnica de microarranjo. Interessantemente, as maiores diferenças de expressão foram observadas para genes envolvidos no sistema imunológico como o *irf7* e o *mhc2A*.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na formação de ovócitos de boa qualidade, Zarski et al (2017) aplicaram a técnica de microarranjo com a finalidade de identificar o perfil de transcritos entre ovos de boa e má qualidade produzidos no robalo europeu. Nesse estudo, foram identificados 39 genes expressos diferencialmente entre os dois grupos de ovos, sendo que a expressão de 8 genes foi, posteriormente, avaliada através de PCR em tempo real. Os resultados mostraram que os genes *usp5*, *polk*, *plec*, *irf7*, *hy-prot (1)* e *mem-prot* apresentaram maiores níveis de expressão em ovos de boa qualidade, por outro lado, a expressão do gene *kctd12* foi maior em ovos de má qualidade. Esses resultados sugerem que genes envolvidos na ubiquitinação de proteína, tradução, reparo de DNA e estrutura e arquitetura celular devem ter uma relação com a qualidade de ovos.

Na enguia do Japão (*Anguilla japonica*), Izumi et al. (2019) também investigaram o perfil transcriptômico entre ovos de boa e má qualidade utilizando RNA-seq e, posteriormente, confirmaram a expressão dos genes diferencialmente expressos através de qPCR. Esse estudo revelou que seis genes (*dnajb4*, *gnpat*, *card14*, *pdp1*, *fcgfp*, *tnn*) foram altamente expressos em ovos de boa qualidade e cinco genes (*gnpat*, *b4galnt1*, *acsl6*, *rtkn* e *trim24*) transferidos matematicamente foram significativamente correlacionados com a taxa de eclosão.

Em zebrafish, Cheung e colaboradores (2019) identificaram 66 transcritos diferencialmente expressos em ovos de qualidade variável através de uma análise de microarranjo. Com base nesses resultados, eles silenciaram a expressão dos genes *otulina* (deubiquitinase com especificidade de ligação linear a) e *slc29a1a* (pertencente ao grupamento portador soluto 29, membro 1a) usando a técnica de edição de genoma mediada por CRISPR/Cas9 e verificaram que o silenciamento desses genes causa uma drástica diminuição nas taxas de fertilização dos animais, demonstrando que esses genes têm uma importância fundamental no processo de fertilização.

Embora vários estudos tenham sido realizados em diferentes espécies de peixes para identificar um conjunto de transcritos que realmente estejam associados com a qualidade de ovócitos, os resultados ainda apresentam pouca consistência, conforme já foi apontado por Sullivan e colaboradores (2015). Essa falta de consistência para encontrar um conjunto de genes que estivessem relacionados com a qualidade dos ovócitos pode estar relacionada as diferenças de espécies ou diferenças entre os estudos com relação ao desenho experimental, amostragem ou nos diferentes métodos analíticos empregados em cada pesquisa (Lubzens et al., 2017). Na tentativa de encontrar esse conjunto de genes maternos, Chapman et al. (2014) empregaram a inteligência artificial para determinar uma “impressão digital” que tivesse uma relação direta com a qualidade dos ovos e, conseqüentemente, com a sobrevivência e o desenvolvimento normal do embrião até o estágio de blástula. Nesse sentido, eles encontraram 233 genes, que representam apenas 2% do transcriptoma ovariano, que explica 90% da variância na sobrevivência dos embriões no robalo riscado (*Morone saxatilis*). Essa pesquisa demonstra que disfunções no desenvolvimento embrionário estão relacionados com um perfil transcriptômico e podem ser preditivas.

**Tabela 2.** Transcritos maternos relacionados à qualidade de gametas em teleósteos.

<b>Espécie</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Função</b>	<b>Expressão em gametas de boa qualidade</b>	<b>Abreviação do gene</b>	<b>Referência</b>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fator de crescimento tipo insulina I	Envolvido no desenvolvimento	Alta	<i>igf-1</i>	Aegerter et al., 2004/

	e crescimento.			Aegerter et al., 2005
Fator de crescimento tipo insulina II	Envolvido no desenvolvimento e crescimento.	Alta	<i>igf-2</i>	
Fator de crescimento de insulina receptor 1B	Envolvido no crescimento e sobrevivência celular.	Alta	<i>igfr1b</i>	
Nucleoplasmina	Envolvido na reprogramação da cromatina, especialmente durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial.	Alta	<i>npm2</i>	
Beta tubulina classe I	Constituinte dos microtúbulos.	Alta	<i>tubb</i>	
Catepsina Z	Atua como uma cisteína protease lisossomal.	Baixa	<i>ctsz</i>	
Ciclina B	Atuam no controle do ciclo celular.	Baixa	<i>cycB</i>	
Queratina 8	Atua na manutenção da integridade estrutural celular e também na transdução de sinal e diferenciação celular.	Baixa	<i>krt8</i>	
Queratina 18	Atua na manutenção da integridade estrutural celular e também na transdução de sinal e diferenciação	Baixa	<i>krt18</i>	

		celular.			
	Prostaglandina sintase	Controle de processos reprodutivos.	Baixa	<i>ptgs2</i>	Bonnet et al., 2007
	Proibitina 2	Apresenta atividade pleiotrópica.	Baixa	<i>phb2</i>	
<b><i>Gadus morhua</i></b>	Glutationa peroxidase	Controle dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos	Alta	<i>gsh-px</i>	Lanes et al., 2012
	Proteínas de choque térmico de 70 kDa	Resposta ao estresse	Baixa	<i>hsp70</i>	Rise et al., 2014
	Discoidina	A função de DCBLD1 permanece incerta.	Baixa	<i>dcbl1</i>	
	Dopa Descarboxilase	Atua na síntese de dopamina e serotonina.	Baixa	<i>ddc</i>	
	Aminoacilase 3	Envolvida em processos metabólicos.	Baixa	<i>acy3</i>	
	Subunidade alfa de carioferina 7	Envolvida no transporte de moléculas entre o citoplasma e o núcleo.	Alta	<i>kpna7</i>	
	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase	Regula uma série de processos celulares.	Alta	<i>hacd1</i>	
<b><i>Dicentrarchus labrax</i></b>	Peptidase específica da ubiquitina 5	Envolvida no metabolismo de proteínas e em diversas funções celulares, como manutenção da estrutura da cromatina, função do receptor e degradação de proteínas anormais.	Alta	<i>usp5</i>	Zarski et al., 2017

	DNA Polimerase Kappa	Envolvida no reparo de DNA	Alta	<i>polk</i>	
	Plectina	Estrutura do citoesqueleto	Alta	<i>plec</i>	
	Interferon 7	Envolvido na resposta imunológica.	Alta	<i>irf7</i>	
	Proteína KCTD12 contendo domínio BTB/POZ	Regulação da via de sinalização da proteína G do receptor acoplado à proteína	Baixa	<i>kctd12</i>	
<b><i>Anguilla japonica</i></b>	Membro B4 da família de proteínas de choque térmico DNAJ (Hsp40)	Dobramento de proteínas	Alta	<i>dnajb4</i>	Izumi et al., 2019
	Gliceronafofato O-Aciltransferase	Essencial para a síntese de fosfolipídios de éter	Alta	<i>gnpat</i>	
	Membro da família 14 do domínio de recrutamento da Caspase	Regulação do processo de apoptose	Alta	<i>card14</i>	
	Subunidade catalítica 1 da piruvato desidrogenase fosfatase	Catalisa a fosforilação de proteínas	Alta	<i>pdp1</i>	
	Titin	Desenvolvimento do tecido muscular esquelético	Alta	<i>ttn</i>	
	Beta-1,4 N-acetilgalactosamina transferase 1	Glicosilação lipídica	Alta	<i>b4galnt1</i>	
	Membro da família 6 de cadeia longa da acil-CoA sintetase	Responsável por ativar ácidos graxos, produzindo acil-CoA, e distribuí-los entre diversas vias metabólicas no interior da célula.	Alta	<i>acsl6</i>	
	Rhotekin	Interage com as proteínas Rho ligadas a	Alta	<i>rtkn</i>	

		guanosina trifosfato.			
	Motivo tripartido contendo 24	Envolvido no controle transcricional.	Alta	<i>trim24</i>	
<i>Danio rerio</i>	Deubiquitinase com especificidade de ligação linear a	Fornece as instruções para a formação de proteínas de respostas imunológicas	Alta	<i>otulina</i>	Cheung et al., 2019
	Pertencente ao grupamento portador soluto 29, membro 1a	Fornece instruções para a formação de proteínas específicas	Alta	<i>slc29a1a</i>	

### Estudos transcriptômicos com peixes nativos

O recente desenvolvimento de técnicas de sequenciamento e estudos de perfis transcricionais em peixes permitiu que os pesquisadores utilizassem essas novas tecnologias em espécies nativas brasileiras. Estudos utilizando as novas plataformas de sequenciamento já foram realizados em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) [Mastrochirico-Filho et al., 2020], pirarucu (*Arapaima gigas*) [Watanabe et al., 2018], tambaqui (*Colossoma macropomum*) [Gomes et al., 2019] e no surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*) [Zerlotini et al., 2019].

Na área da reprodução de espécies nativas somente Watanabe e colaboradores (2018) aplicaram a plataforma 454 para identificar genes relacionados a diferenciação sexual em pirarucu, já que o mesmo não apresenta dimorfismo sexual e isso dificulta o processo reprodutivo em cativeiro. Nesse estudo, foi possível identificar 105 genes diferencialmente expressos no fígado e 204 genes diferencialmente expressos na pele entre machos e fêmeas, com 95 apresentando altos níveis de expressão nas fêmeas e 214 nos machos. Esse estudo deverá auxiliar em estudos futuros para identificação do sexo em pirarucu, e consequentemente, facilitar o manejo reprodutivo dessa espécie em cativeiro.

Embora, nenhum desses estudos tenha sido realizado com a finalidade de identificar transcritos relacionados com a qualidade de gametas, a obtenção de informações genéticas das espécies nativas deve facilitar futuros estudos nessa área e, consequentemente, ajudar a entender os parâmetros genéticos relacionados com a qualidade de gametas em espécies nativas.

### Considerações finais

Os recentes estudos na área de biotecnologia da reprodução em peixes foram capazes de melhorar o entendimento de como os transcritos presentes nos gametas feminino e masculino podem afetar o sucesso da fertilização e a viabilidade das larvas recém eclodidas. A contribuição materna na fertilização e durante o desenvolvimento embrionário já era bem conhecida, entretanto, estudos recentes demonstram que a célula reprodutiva masculina tem um importante papel além do transporte do genoma para o ovócito. Esses estudos comprovam que os espermatozoides possuem importantes RNAs que no momento da fertilização são inseridos no ovócito e que, muitos destes permanecem ativos até a ativação do genoma embrionário. Ainda não é possível afirmar o “pool” de genes capaz de identificar fatores viáveis nas células reprodutivas de diferentes espécies, já que vários estudos em uma mesma espécie obtêm resultados distintos. Entretanto, a técnica de edição gênica CRISPR/ CAS9 talvez ajude a esclarecer e identificar os genes específicos responsáveis pela qualidade dos gametas. A maioria dos

estudos encontrados até o momento são relacionados as espécies marinhas, porém, os conhecimentos já adquiridos poderão ser determinantes para elucidar a compreensão sobre as espécies nativas brasileira.

### Referências

- AEGERTER, S.; JALABERT, B.; BOBE, J.** Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulinlike growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, 67, 127–135. [CrossRef] [PubMed]
- AEGERTER, S.; JALABERT, B.; BOBE, J.** Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol. Reprod. Dev. Incomp. Gamete Res.* 2005, 72, 377–385. [CrossRef] [PubMed]
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R.** Fundamentos da Biologia Moderna. 2. ed. rev. São Paulo: Moderna, 1997. In: AMABIS, J. M. 1947. Fundamentos da biologia moderna.
- BALDISSEROTTO, B.** Fisiologia de Peixes aplicada à piscicultura. 3.ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2018. 352p.
- BAZZOLI N.** Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho HP, Godinho AL (Org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.291-306.
- BESSEAU, L.; FUENTÉS, M.; SAUZET, S.; BEAUCHAUD, M.; CHATAIN, B.; COVÉS, D.; BOEUF, G.; FALCÓN, J.** Somatotropic axis genes are expressed before pituitary onset during zebrafish and sea bass development. *General and comparative endocrinology.* 194C: 133-141. 2013.
- BISSONNETTE, N.; LEVESQUE-SERGERIE, J. P.; THIBAUT, C.; BOISSONNEAULT, G.** Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction*, v.138, p.65-80, 2009.
- BOBE, J.** Egg quality in fish: Present and future challenges. *Fish Physiology and Genomics, Animal Frontiers.* France, 2015.
- BOBE, J.; LABBÉ, C.,** 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 165, 535–548.
- BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M.** (2007). A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, 68:S147-S155.
- BONNET, E., FOSTIER, A., BOBE, J.,** 2007. Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *BMC Genomics* 8, 55.
- BOULEAU, A.; DESVIGNES, T.; TRAVERSO, J. M.; NGUYEN, T.; CHESNEL, F.; FAUVEL, C.; BOBE, J.** Maternally inherited *npm2* mRNA is crucial for egg developmental competence in zebrafish. *Biol. Reprod.* Aug;91 (2): 43. 2014. doi: 10.1095/biolreprod.114.119925. Epub 2014 Jul 9.
- CABRITA E, MARTÍNEZ-PÁRAMOA S, GAVAIA PJ, RIESCO MF, VALCARCE DG, SARASQUETE C ET AL.** (2014) Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 432: 389–401.
- CARTON-GARCÍA F, RIESCO M, CABRITA E, HERRÁEZ M, ROBLES V** (2013) Quantification of lesions in nuclear and mitochondrial genes of *Sparus aurata* cryopreserved sperm. *Aquaculture* 402–403: 106–112.
- CHAPMAN, R.W.; READING, B.J.; SULLIVAN, C.V.** Ovary transcriptome profiling via artificial intelligence reveals a transcriptomic fingerprint predicting egg quality in striped bass, *Morone saxatilis*. *PLoS ONE* 2014, 9, e 96818. [CrossRef] [PubMed]
- CHEUNG CT, NGUYEN TV, CAM AL, PATINOTE A, JOURNOT L, REYNES C, BOBE J.** What makes a bad egg? Egg transcriptome reveals dysregulation of translational machinery and novel fertility genes important for fertilization. (2019) 20:584. <http://doi.org/10.1186/s12864-019-5930-8>
- CHUMA S, HOSOKAWA H, KITAMURA K, KASAI S, FUJIOKA H, HIYOSHI H, TAKAMUNE K, NOCE T, NAKATSUJI N.** 2006. Tdrd1/ Mtr - 1, um gene relacionado a tudor, é essencial para a diferenciação de células germinativas masculinas e formação de nuage/ grânulo germinativo em camundongos. *Proc Natl Acad Sci EUA* 103: 15894- 15899.
- DADOUNE, J.P.; PAWLAK, A.; ALFONSI, M.F.; SIFFROI, J.P.** 2005. Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 11, 133–140.
- FANG P, ZENG P, WANG Z, LIU M, XU W, DAI J, ZHAO X, ZHANG D, LIANG D, CHEN X et al.,** 2014. Estimated diversity of messenger RNAs in each murine spermatozoa and their potential

- function During early zygotic development. *Biology of Reproduction* 90-94. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.117788>
- FARLEY BM, RYDER SP.** (2008) Regulation of maternal mRNAs in early development. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43:135-162.
- FEUGANG, J. M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G. C.; TOPPER, E. K.; MEMILI, E.** Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reprod Biomed Online*, v.21, p.312- 324, 2010.
- FIGUEROA, E.; LEE-ESTÉVEZ, M.; VALDEBENITO, I.; FARIÁS, J. G.; ROMERO, J.** Potential biomarkers of DNA quality in cryopreserved fish sperm: impact on gene expression and embryonic development. *Reviews in Aquaculture*. v.12. p.382-391. 2018. <http://doi.org/10.1111/raq.12323>
- GARCÍA-HERRERO, S.; GARRIDO, N.; MARTÍNEZ-CONEJERO, J.A.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A.; MESEGUER, M.** 2011. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 22, 25–36.
- GILBERT, I.; BISSONNETTE, N.; BOISSONNEAULT, G.; VALLEE, M.; ROBERT, C.** A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. *Reproduction*, v.133, p.1073-1086, 2007.
- GIRALDEZ, A.J.; MISHIMA, Y.; RIHEL, J.; GROCOCK, R. J.; DONGEN, S. V.; INOUE, K.; ENRIGHT, A.; SCHIER, A. F.** 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75–79
- GOMES, F.; WATANABE, L.; VIANEZ, J.; NUNES, M.; CARDOSO, J.; LIMA, C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.** Comparative analysis of the transcriptome of the Amazonian fish species *Colossoma macropomum* (tambaqui) and hybrid tambacu by next generation sequencing. *PLOS ONE*. 2019. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0212755>
- GONZÁLEZ-ROJO S, FERNÁNDEZ-DÍEZ C, GUERRA SM, ROBLES V, HERRAEZ MP** (2014) Differential gene susceptibility to sperm DNA damage: analysis of developmental key genes in trout. *PLoS ONE* 9 (12): e114161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114161>.
- GRIER J. H., URIBE-ARANZÁBAL M. C., PATIÑO R.** 2009. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: Jamieson BJM, editor. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa* Enfield: Science Publishers; p.25-84.
- GUERRA, S.M.; VALCARCE, D.G.; CABRITA, E., ROBLES, V.** (2013). Analysis of transcripts in gilthead seabream sperm and zebrafish testicular cells: mRNA profile as a predictor of gamete quality. *Aquaculture*, 406-407:28-33.
- HAMATANI, T.** (2012) Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril* 97(2):275-281. DOI 10.1016/j.fertnstert.2011.12.035 [doi]
- HEAD JR, KRESGE CK.** 1985. Reaction of the chromatoid body with a monoclonal antibody to a rat histocompatibility antigen. *Biol Reprod* 33:1001–1008.
- HERRÁEZ MP, AUSIO J, DEVAUX A, GONZÁLEZ-ROJO S, FERNÁNDEZ-DÍEZ C, BONY S ET AL.** (2017) Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish. *Aquaculture* 472: 45–59.
- HERRÁEZ, MARÍA PAZ, AUSIÓ, JUAN, DEVAUX, ALAIN, GONZÁLEZ-ROJO, SILVIA, FERNÁNDEZ-DÍEZ, CRISTINA, BONY, SYLVIE, SAPERAS, NÚRIA, ROBLES, VANESA.** Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish, *Aquaculture* (2016), doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.00
- HOSKEN, D. J.; HODGSON, D. J.** (2014) Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. *Trends Ecol Evol* 29(8):451-455. DOI 10.1016/j.tree.2014.05.006 [doi]
- IZUMI, H.; GEN, K.; LOKMAN, P. M.; HAGIHARA, S.; HORIUCHI, M.; TANAKA, T.; IJIRI, S.; ADACHI, S.** Maternal transcripts in good and poor quality eggs from Japanese eel, *Anguilla japonica* – their identification by large – scale quantitative analysis. *Mol Reprod. Dev. Dec:* 86(12): 1846-1864. doi: 10.1002/mrd.23273. 2019.
- JAMIESON, B.G.M.** 1991. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge.
- JODAR, M.; KALKO, S.; CASTILLO, J.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R.** Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod*, v.27, p.1431-1438, 2012.
- JODAR, M.; SELVARAJU, S.; SENDLER, E.; DIAMOND, M.P.; KRAWETZ, S.A.** (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Human Reproduction Update*, 19: 604-624.

- JOHNSON, G. D.; LALANCETTE, C.; LINNEMANN, A. K.; LEDUC, F.; BOISSONNEAULT, G.; KRAWETZ, S. A.** (2011) The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* 141(1):21-36. DOI 10.1530/REP-10-0322 [doi]
- KJØRSVIK, E., MANGOR-JENSEN, A., HOLMEFJORD, I.** (1990). Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology*, 26:71-113.
- KOTAJA, N.** 2006. Interplay of PIWI/Argonaute protein MIWI and kinesin KIF17b in chromatoid bodies of male germ cells. *J. Cell Sci.* 119, 2819–2825. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03022>.
- KUMAR, G. & KOCOUR, M.** Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review *Fisheries Research*. Volume 186, Part 1, February 2017, Pages 11-22.
- KUMAR, G. & KOCOUR, M.** Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review *Fisheries Research*. Volume 186, Part 1, February 2017, Pages 11-22.
- KUNG, J. T. Y.; COLOGNORI, D.; LEE, J. T.** 2013. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 193, 651–669. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.146704>.
- Lee, T.-L., Xiao, A., Rennert, O.M., 2012. Identification of novel long noncoding RNA transcripts in male germ cells. *Methods Mol. Biol.* 825, 105–114. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-436-0\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-436-0_9).
- LALANCETTE, C.; THIBAUT, C.; BACHAND, I.; CARON, N.; BISSONNETTE, N.** Transcriptome analysis of bull semen with extreme nonreturn rate: use of suppression-subtractive hybridization to identify functional markers for fertility. *Biol Reprod*, v.78, p.618-635, 2008.
- LANES, C.F.C.; BIZUAYEHU, T. T.; FERNANDES, J. M. O.; KIRON, V.; BABIAK, I.** 2013. Transcriptome of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) early embryos from farmed and wild broodstocks. *Mar. Biotechnol.* 15, 677–694
- LANES, C. F. C.; FERNANDES, J. M. O.; KIRON, V.; BABIAK, I.** Profiling of key apoptotic, stress, and immune-related transcripts during embryonic and postembryonic development of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Theriogenology* 78 (2012) 1583–1596.
- LIU, Y.; ZHU, Z.; HO, I. H.T.; SHI, Y.; LI, J.; WANG, X.; CHAN, M. T.V.; CHENG, C. H.K.** Genetic Deletion of *miR-430* Disrupts Maternal-Zygotic Transition and Embryonic Body Plan. *Front. Genet.* 2020. <http://doi.org/10.3389/fgene.2020.00853>
- LUBZENS, E.; BOBE, J.; YOUNG, G.; SULLIVAN, C. V.** (2016). Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo and its contributions to fertility and early development. *Aquaculture*. v. 472. p. 107-143.
- MARTA F. RIESCO, DAVID G. VALCARCE, JUAN MANUEL MARTÍNEZ-VÁZQUEZ & VANESA ROBLES.** Effect of low sperm quality on progeny: a study on zebrafish as model species. *Scientific Reports* volume 9, Article number: 11192 (2019)
- MASTROCHIRICO-FILHO, V. A.; HATA, M. E.; KURADOMI, R. Y.; FREITAS, M. V.; ARIEDE, R. B.; PINHEIRO, D. G.; ROBLEDO, D.; HOUSTON, R.; HASHIMOTO, D. T.** Transcriptome Profiling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*: Inference on immune gene response. *Frontiers in Genetics*. v.11, 2020.
- MATHAVAN, S.; SERENE, G.P.L.; ALICIA, M.; LANCE, D.M.; KARUTURI, R.K.M.; KUNDE, R.; GOVINDARAJAN, Y.T.; WU, Y.L.; LAM, S.H.; YANG, H.; ET AL.** Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *PLoS Genet.* 2005, 1, e29. [CrossRef] [PubMed]
- MEIKAR, O.; DA ROS, M.; KORHONEN, H.; KOTAJA, N.** 2011. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction* 142, 195–209. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-11-0057>.
- MEIKAR, O.; VAGIN, V.V.; CHALMEL, F.; SÖSTAR, K.; LARDENOIS, A.; HAMMELL, M.; JIN, Y.; DA ROS, M.; WASIK, K.A.; TOPPARI, J.; HANNON, G.J.; KOTAJA, N.** 2014. An atlas of chromatoid body components. *RNA* 20, 483–495. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.043729.113>.
- MIGAUD, H., BELL, G., CABRITA, E., MCANDREW, B., DAVIE, A., BOBE, J., HERRÁEZ, M.P., CARRILLO, M.** (2013). Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Reviews in Aquaculture*, 5:S194-S223.
- MILLER, D.; OSTERMEIER, G.C.; KRAWETZ, S.A.** (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in Molecular Medicine*, 156-163.
- MOMMENS, M.; FERNANDES, J. M. O.; TOLLEFSEN, K. E.; JOHNSTON, I. A.; BABIAK, I.** Profiling of the embryonic Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) transcriptome reveals maternal transcripts as potential markers of embryo quality. *BMC Genomics*. v.15, Article number: 829 (2014).
- MONESI V.** 1965. Atividades sintéticas durante a espermatogênese no RNA e na proteína de camundongo. *Exp Cell Res* 39: 197 - 224.
- NAGAMORI, I.; SASSONE-CORSI, P.** The chromatoid body of male germ cells Epigenetic control and miRNA pathway. *Cell Cycle*, 3503-3508; 15. vol.7. Issue 22. 2008.

- NISHIMURA, R. C.; DODE, M. A. N.** RNAs de espermatozoides: qual sua função fisiológica?. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.38, n.1, p.32-36, jan/ mar. 2014.
- OSTERMEIER, G. C.; DIX, D. J.; MILLER, D.; KHATRI, P.; KRAWETZ, S. A.** (2002). Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 360 (9335): 772-777. DOI S0140-6736 (02) 09899 – 9 [pii].
- PATIÑO R., SULLIVAN C. V.** 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem*; 26: 57-70
- PELEGRI F.** Maternal factors in zebrafish development. *Dev Dyn* 2003; 228:535–54.
- PÉREZ-CEREZALES S, GUTIÉRREZ-ADÁN A, MARTÍNEZ-PARAMO S, BEIRÃO J, HERRÁEZ MP** (2011) Altered gene transcription and telomere length in trout embryo and larvae obtained with DNA cryodamaged sperm. *Theriogenology* 76: 1234–1245.
- PERUQUETTI, R.L.; TABOGA, S.R.; DE AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.** 2010. Nucleolar cycle and its correlation with chromatoid bodies in the *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae) spermatogenesis. *Anat. Rec. (Hoboken)* 293, 900–910. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.21099>.
- QIAN, XI.; BA, YI.; ZHUANG, Q.; ZHONG, G.** RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. *A Journal of Integrative Biology*. v. 18, n 00, 2014.
- RADAEL, M. C.; FOSSE, P. J.; SILVA, R. M.; FILHO, J. C. F.; ANDRADE, D. R.; JUNIOR, M. V. V.** Descrição morfológica dos ovários do peixe *Melanotaenia boesemani* em atividade reprodutiva. *Pesq. Vet. Bras.* 36(9): 893-900, setembro 2016.
- READING, B. J.; ANDERSEN, L. K.; RYU, Y.W; MUSHIROBIRA, Y.; TODO, T.; HIRAMATSU, N.** Oogenesis and Egg Quality in Finfish: Yolk Formation and Other Factors Influencing Female Fertility. *Fishes* 2018, 3, 45; doi:10.3390/fishes3040045
- RIESCO MF, ROBLES V** (2013) Cryopreservation causes genetic and epigenetic changes in zebrafish genital ridges. *PLoS ONE* 8 (6): e67614.
- RIESCO, F. M.; VALCARCE1, D.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ1, J. M.; ROBLES, V.** Effect of low sperm quality on progeny: a study on zebrafish as model species. *Scientific Reports* | (2019) 9:11192 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47702-7>
- RIESCO, M. F.; OLIVEIRA, C.; SOARES, F.; GAVAIA, P. J.; DINIS, M. T.; CABRITA, E.** *Solea senegalensis* sperm cryopreservation: New insights on sperm quality. *PLoS ONE* 12(10): e0186542. October 20, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186542>
- RISE, ML, NASH GW, HALL JR, BOOMAN M, HORI TS, TRIPPEL EA, et al.** Variation in embryonic mortality and maternal transcript expression among Atlantic cod (*Gadus morhua*) broodstock: a functional genomics study. *Mar Genomics*. 2014; 18 Pt A:3–20.
- ROBLES, M. S.; HUMPHREY, S. J.; MANN, M.** Phosphorylation is a central mechanism for circadian control of metabolism and physiology. *Cell Metab.* 10;25(1):118-127. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.004. 2017.
- ROTHSCHILD, A. M.; ROTHSCCHILD, Z.; DUARTE, F. A. M.; MARQUES, M. H. C.** *Biologia do Desenvolvimento*. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora, 2003. In: GILBERT, S. F. *Developmental biology*, Fifth Edition (1949).
- SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LE GAC, F. CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T.** Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*. v. 165, p. 390-411, 2010.
- SHEN-ORR SS, PILPEL Y, HUNTER CP.** (2010) Composition and regulation of maternal and zygotic transcriptomes reflects species-specific reproductive mode. *Genome Biol* 11:R58.
- SODERSTROM, K.O.; PARVINEN, M.** 1976. Incorporation of (3H) uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *J. Cell Biol.* 70, 239–246.
- SULLIVAN, C.V.; CHAPMAN, R.W.; READING, B.J.; ANDERSON, P.E.** Transcriptomics of mRNA and egg quality in farmed fish: Some recent developments and future directions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015, 221, 23–30. [CrossRef] [PubMed]
- TATA, J.R.** (1986). Coordinated assembly of the developing egg. *Bioessays*, 4:197-201.
- TRAVERSO, J. M.; FOSTIER, A.; BOBE, J.** Egg Transcriptome, the Maternal Legacy to the Embryo. *Aquaculture Biotechnology*, First Edition. Edited by Garth L. Fletcher and Matthew L. Rise. 2012. John Wiley & Sons, Ltd.
- TYLER C. R., SUMPTER J. P.** 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fisher*; 6:287-318.
- VALCARCE, D. G.; PARDO, M. Á.; RIESCO, F. M.; CRUZ, Z.; ROBLES, V.** Effect of diet supplementation with a commercial probiotic containing *Pediococcus acidilactici* (Lindner, 1887) on the

expression of five quality markers in zebrafish (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) testis First published: 08 May 2015 <https://doi.org/10.1111/jai.12731>Citations: 10

**VALDEBENITO, I. I.; GALLEGOS, P. C.; EFFER, R.** Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote*: p.1-21. Cambridge University Press 2013.

**VALENCIA-SANCHEZ, M.A.; LIU, J.; HANNON, G.J.; PARKER, R.** 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20, 515–524. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1399806>.

**VESTERLUND L, JIAO H, UNNEBERG P, HOVATTA O, KERE J.** (2011) The zebrafish transcriptome during early development. *BMC Dev Biol* 11:30.

**VÍLCHEZ, M. C.; SANTANGELI S.; MARADONNA F.; GIOACCHINI G.; VERDENELLI C.; GALLEGOS, V.; PEÑARANDA, D. S.; TVEITEN, H.; PÉREZ, L.; CARNEVALI O.; ASTURIANO, J. F.** Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel spermatogenesis. *Teriogenologia*. Novembro de 2015; 84 (8): 1321-31. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.011. Epub 2015, 17 de julho.

**WANG, X.; LIU, P.; ZHU, H.; XU, Y.; MA, C.; DAI, X.; HUANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, L. & QIN, C.** (2009). miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull* 80, 268-73.

**WATANABE, L; GOMES, F.; VIANEZ, J.; NUNES, M.; CARDOSO, J.; LIMA, C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.** *De novo* transcriptome based on next-generation sequencing reveals candidate genes with sex-specific expression in *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), an ancient Amazonian freshwater fish. *PLOS ONE*. 2018. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0206379>

**YADAV, R.P.; KOTAJA, N.** 2014. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 498–508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.015>.

**YUAN, Y.; LI, M.; HONG, Y.** 2014. Light and electron microscopic analyses of Vasa expression in adult germ cells of the fish medaka. *Gene* 545, 15–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.017>.

**ZARSKI, D.; NGUYEN, T.; LE CAM, A.; MONTFORT, J.; DUTTO, G.; ODILE VIDAL, M.; FAUVEL, C.; BOBE, J.** Transcriptomic profiling of egg quality in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sheds light on genes involved in ubiquitination and translation. *Mar. Biotechnol.* 2017, 19, 102–115. [CrossRef] [PubMed]

**ZERLOTINI, A.; LOBO, F. P.; CINTRA, L. C.; YAMAGISHI, M. E. B.; VARELA, E. S.; PAIVA, S. R.; IANELLA, P.; CAETANO, A. R.** Genome Sequencing and *de novo* Assembly of the South American Tiger Catfish (*Pseudoplatystoma punctifer*) Using 10X Sequencing Data. Plant and Animal Genome XXVII Conference. San Diego, CA. 2019.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Para o sucesso da reprodução de peixes em cativeiro é fundamental o reconhecimento entre ovos de boa e má qualidade, bem como, avaliar a qualidade espermatozoides. Protocolos informativos e o controle de manejo dos animais são fatores condicionantes para escolha de bons reprodutores. Investigações a nível transcricional estabelecem uma base de dados concreta dos mecanismos genéticos que contribuem positivamente para esse resultado.

O conhecimento adquirido através de análises genéticas pode identificar a taxa de sobrevivência dos embriões e, além disso, gerar uma base importante para aplicações futuras na aquicultura (Bobe, 2015). Em geral, a utilização de ferramentas tecnológicas para avaliar a qualidade dos ovócitos e espermatozoides resultou no conhecimento de centenas de genes que estão envolvidos em diferentes processos celulares (Sullivan et al., 2015).

Considerando os dados já obtidos nas áreas de reprodução humana e animal, pesquisas mais detalhadas em peixes são imprescindíveis para melhorar o entendimento de como os transcritos presentes nas células reprodutivas podem afetar as taxas de fertilização e, conseqüentemente, a qualidade das larvas recém-eclodidas. Apesar de ainda não estar claro um conjunto específico de transcritos relacionados com a qualidade de gametas, parece claro que os mRNAs maternos e paternos contribuem significativamente para o sucesso da fertilização e desenvolvimento de um embrião normal em peixes (Bonnet et al., 2007b; Traverso et al., 2012; Reading et al., 2018).

O levantamento dos transcritos paternos e maternos que vem sendo estudados em diferentes espécies de teleósteos deverá auxiliar nos futuros estudos com as espécies nativas brasileiras, propiciando um melhor entendimento dos fatores genéticos associados a qualidade dos gametas e, conseqüentemente, no desenvolvimento larval.

#### 4 REFERÊNCIAS

AEGERTER, S.; JALABERT, B.; BOBE, J. Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. **Mol. Reprod. Dev. Incomp. Gamete Res.** 2005, 72, 377–385. [CrossRef] [PubMed]

ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.174-180, abr./jun. 2013. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

AMANN R, KATZ DF. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v.25, p.317-325, 2004.

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v.27, n.2, p.166-172, Abr/Jun, 2003.

ANDRADE, E. S.; ANDRADE, E. A.; FELIZARDO, V. O.; PAULA, D. A. J.; VERAS, G. C.; MURGAS, L. D. S. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.195-201, jan./mar. 2015.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.8-16, 2007.

ASHAN, S.N. Cyclical changes in the testicular activity of the Lake Chub, *Clouesius plumbeus* (Agassiz). **Canadian Journal of Zoology**, v.44, p.149-177, 1966.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de Peixes aplicada à piscicultura. 3.ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2018. 352p.

BAZZOLI N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho HP, Godinho AL (Org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: **PUC Minas**, 2003. p.291-306.

BAZZOLI N, RIZZO E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in the tem Brazillian teleost fish specie. **Eur Arch Biol**, v.101, p.399-410, 1990.

BILLARD, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. **Aquaculture**. 100, 263–298.

BOBE, J. Egg quality in fish: Present and future challenges. Fish Physiology and Genomics, **Animal Frontiers**. France, 2015.

BOBE, J.; LABBÉ, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. **Gen Comp Endocrinol**. 165, 535–548.

BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; NATALI, M. R. M.; SANCHES, E. A.; PIANA, P. A. Desempenho reprodutivo e zootécnico e deposição de lipídios nos hepatócitos de fêmeas de tilápia-do-nylo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.8. p.1391-1399. Agosto, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000800001>

BONISLAWSKA M, FORMICKI K, KORZELECKA-ORKISZ A, WINNICKI A. Fish egg size variability: biological significance. **Electr J Pol Agric Univ Fish**, v.4, n.2, p.1-15. 2001.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **ACTA Amazônica**. Vol. 36(3). 349-356. 2006

BRISTOL-GOULD S, WOODRUFF TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.5- 13, 2006.

BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Eds) **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Blackwell Science Ltd., Oxford, 1995, p. 424.

CABALLERO, M.J.; IZQUIERDO, M.S.; KJORSVIK, E. et al. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus auratus* L., caused by short- or long - term feeding with vegetable oils as the sole lipid source. **Journal of Fish Disease**, v.27, p.531- 541, 2004.

CAETANO, A. R.; IANELLA, P.; VARELA, E. S.; PAIVA, S. R.; LOBO, F. P.; CINTRA, L. C.; NETO, A. Z.; YAMAGISHI, M. E. B. Genome Sequencing and de novo Assembly of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture 2019**. New Orleans, Louisiana.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R. et al. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p.289-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHEN J, HU W, ZHU ZY. Progress in studies of fish reproductive development regulation. **Chin Sci Bull**, v.58, p.7-16, 2013

CHEN W, GE W. Ontogenic expression profiles of gonadotropins (*FSHB* and *LHB*) and growth hormone (*GH*) during sexual differentiation and puberty onset in female zebrafish. **Biol Reprod.**, v.86, p.73, 2012.

DE VIAMING, V.L. Efeccts of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost *Notemigonus crysotucas*. **Biology Bull**, v.148, p.402-415, 1975.

DONALD TS, HICKMAN R, HOSKINS DD. Description, validation and performace characteristic of a new computer-automated sperm motility analysis system. **Biol Reprod**, v.38, p.577-586, 1988.

DUFOUR, S., SEBERT, M.E., WELTZIEN, F.A., ROUSSEAU, K., PASQUALINI, C. 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. **J Fish Biol.** 76, 129-160.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges.** 2016.

FARREL P. B., FOOTE R. N., MCARDLE M. M., TROUERN-TREND V. L., TARDIF A. L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **J Androl**, v.17, p.293-300, 1996.

FELIX, F.; OLIVEIRA, C. C. V.; CABRITA, E. Antioxidants in Fish Sperm and the Potential Role of Melatonin. **Antioxidants 2021**, 10, 36.  
<http://doi.org/10.3390/antiox100110036>

FELIZARDO VO, MURGAS LDS, ANDRADE ES, LÓPEZ PA, FREITAS RTF, FERREIRA MR. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, v.77, p.1570-1574, 2012.

GALO, J. M. **Avaliação da qualidade dos gametas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva.** 2013. 110 p. Tese para o título de doutora em Zootecnia – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias. Maringá/PR, 2013.

GALO, J.M.; STREIT-JR, D.P.; SIROL, R.N. et al. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal Biology**, v.71, p.1-7, 2011.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.399-404, 1999.

GODINHO HP. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.351-360, 2007.

GODOY, L. C. et al. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 347-354, Dec 2013.

GUERRA, S.M.; VALCARCE, D.G.; CABRITA, E., ROBLES, V. (2013). Analysis of transcripts in gilthead seabream sperm and zebrafish testicular cells: mRNA profile as a predictor of gamete quality. **Aquaculture**, 406-407:28-33.

HALANGK, W.; FRANK, K. Bohnensack R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. **Archivos Experience Veterinary Medicine**, v.38, p.105-114, 1984.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HATEF, A.; UNNIAPPAN, S., 2019. Metabolic hormones and the regulation of spermatogenesis in fishes. **Theriogenology** 134, 121-128.

HILSDORF, A. W. S.; PAIVA, S. R. A importância dos recursos genéticos para o futuro de uma aquicultura sustentável. **Revista Panorama da Aquicultura**. v. 30. n. 181. p.46-51. 2021. ISSN 1519- 1141

HONDA A, HIROSE M, HARA K, MATOBA S, INOUE K, MIKI H, HIURA H, KANATSU-SHINOHARA M, KANAI Y, KONO T, SHINOHARA T, OGURA A. Isolation, characterization and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. **Proc Nat Acad Sci**, v.104, p.12389-12394, 2007.

ISEK, K. K.; NEGRÃO, J. A. Controle neuroendócrino da reprodução de peixes teleósteos. **Revista de Ciências Veterinárias**, 1:11-22, 2003.

IZQUIERDO, M.S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v.197, p.25-42, 2001.

JODAR, M.; SELVARAJU, S.; SENDLER, E.; DIAMOND, M.P.; KRAWETZ, S.A. (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. **Human Reproduction Update**, 19: 604-624.

LEIRA, M. H.; BOTEELHO, H. A.; BARRETO, B. B.; SANTOS, H. C. A. S.; BOTEELHO, J. H. V. Piracema: período de preservação dos peixes nativos. **Revista Eletrônica Nutri-time**. v. 15, n.03, Maio/ Jun. de 2018. ISSN: 1983-9006

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.472-482, out./dez. 2011. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

LO NOSTRO, F. L.; GRIER, H.; MEIJIDE, F. J.; GUERRERO, G. A. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue & Cell**. v. 35, p. 121-132, 2003b.

LOWE-MCCONNEL, R.H. Fish communities in tropical freshwater. **Longman, London**, 337p, 1975.

LUCCI CM, SILVA RV, CARVALHO CA, FIGUEIREDO R, BÃO SN. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rumin Res**, v.41, p.61-69, 2001.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MUNRO, A.D. Tropical freshwater fish. In: Munro, A.D.; Scott, A.P.; Lam, T.J. Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences. **CRC Press**, p.145- 239, 1990.

NAGAHAMA, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. **Int J Dev Biol**. 38, 217-229.

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

NAUMOV, V.M. The ovogenesis and ecology of the sexual cycle of the Murmansk herring *Clupea harengus harengus*. **Species Science Reproduction Fish**, v.327, p.203-262, 1956.

NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemical**. v. 35, p. 197-206, 2009.

NÚÑEZ, J.; CHU-KOO, F.; BERLAND, M.; ARÉVALO, L. et al. Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Perú. **Aquaculture Research**, 42, n. 6, p. 815-822, 2011.

NÚÑEZ, J.; DUPONCHELLE, F. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, 35, n. 1, p. 167-180, Mar 2009.

PAPADAKI, M.; PAPADOPOULOU, M.; SIGGELAKI, I. et al. Egg and sperm production and quality of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity. **Aquaculture**, v.276, p.187–197, 2008.

PEIXE BR. Anuário Peixe BR da Piscicultura. **Associação brasileira de piscicultura**. São Paulo/ SP. 2021. [www.peixebr.com.br](http://www.peixebr.com.br)

PEÑA, A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. **Theriogenology**, v.50, p.1211-1220, 1998.

PEREIRA MO, CALZA C, ANJOS MJ, LOPES RT, ARAÚJO FG. Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River (Brazil). **J Radioanal Nuclear Chem**, v.269, p.707-709, 2006.

PIRES, L. B. et al. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. **Animal Reproduction Science**, v. 196, p. 138-142, Sep 2018.

READING, B. J.; ANDERSEN, L. K.; RYU, Y.W; MUSHIROBIRA, Y.; TODO, T.; HIRAMATSU, N. Oogenesis and Egg Quality in Finfish: Yolk Formation and Other Factors Influencing Female Fertility. **Fishes 2018**, 3, 45; doi:10.3390/fishes3040045

SANCHES, E. A. et al. Utilização de azul de trypan para a estimativa a viabilidade de ovócitos em *Steindachneridion parahybae*. **V Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática - AQUACIÊNCIA**. Palmas: Aquabio, 2012. p.

SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M.S. Effects of stress in fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquaculture**, v.197, p.3– 24, 2001.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LE GAC, F. CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**. v. 165, p. 390-411, 2010.

SCHULZ, R.W.; NOBRÉGA, R.H., 2011. Regulation of Spermatogenesis. In: Farrell AP (Ed) **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, Academic Press, San Diego, pp 627–634.

SCOTT, J.A.P.; SUMPTER, P.; STACEY, N., 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 $\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. **J Fish Biol**. 76 (1), 183-224.

SOUZA, N.L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados equinos**. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

SUNDARARAJ, B.I.; VASAL, S. Photoperiod and temperature control in the regulation of reproduction in the female catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Journal Fish Research Board Canada**, v.33, p.959-973, 1976.

THOMAS, C.A.; GANER, D.L.; DEJARNETE, J.M. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

TRAVERSO, J. M.; FOSTIER, A.; BOBE, J. Egg Transcriptome, the Maternal Legacy to the Embryo. **Aquaculture Biotechnology**, First Edition. Edited by Garth L. Fletcher and Matthew L. Rise. 2012. John Wiley & Sons, Ltd.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L. et al. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.41, p.483-89, 1994.

VIALLE, R. A.; SOUZA, J. E. S.; LOPES, K. P.; TEIXEIRA, D. G.; SOBRINHO, P. A. A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. M.; FURTADO, C.; SAKAMOTO, T.; SILVA, F. A. O.; OLIVEIRA, E. H. C.; HAMOY, I. G.; ASSUMPÇÃO, P. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; LIMA, J. P. M. S.; SEUÁNEZ, H. N.; SOUZA, S. J.; SANTOS, S. Whole Genome Sequencing of the Pirarucu (*Arapaima gigas*) Support Independent Emergence of Major Teleost Clades. **Genome Biol. Evol.** 10(9): 2366-2379. doi: 10.1093/gbe/evy130. 2018.

WATANABE, T.; VASSALO-AGIUS, R. Broodstock nutrition research on marine finfish in japan. **Aquaculture**, v.227, p.35-61, 2003.

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormonal responses to stress: Hormone response to stress. *In* **Encyclopedia of Fish Physiology**; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2011; pp. 1515–1523

YAMADA, H.; SATOH, R.; OGOH, M.; TAKAJI, K.; FUJIMOTO, Y.; HAKUBA, T.; CHIBA, H.; KAMBEGAWA, A.; IWATA M., 2002. Circadian changes in serum concentrations of steroids in Japanese char *Salvelinus leucomaenis* at the stage of final maturation. **Zool Sci.** (Tokyo) 19 (8), 891-898.

ZANIBONI – FILHO, E.; WEINGART, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Rev Bras Reprod Anim.** 31, 367-373.

ZERLOTINI, A.; LOBO, F. P.; CINTRA, L. C.; YAMAGISHI, M. E. B.; VARELA, E. S.; PAIVA, S. R.; IANELLA, P.; CAETANO, A. R. Genome Sequencing and de novo Assembly of the South American Tiger Catfish (*Pseudoplatystoma punctifer*) Using 10X Sequencing Data. **Plant and Animal Genome XXVII Conference**. San Diego, CA. 2019.

## 5 ANEXOS – NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL

A presente revisão será submetida a Revista Brasileira de Reprodução Animal (*RBRA*) a fim de contribuir com os conhecimentos científicos da área. A *RBRA*, a partir do volume 29 de 2005 é publicada exclusivamente *on line* e está disponível no website do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - *CBRA* ([www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)). Todas as correspondências deverão ser encaminhadas ao Editor-Chefe Dr. Marcelo Rezende Luz ([rbra@cbra.org.br](mailto:rbra@cbra.org.br)). Todos os artigos submetidos devem ser originais e destinados exclusivamente à publicação na *RBRA*.

### 1. Preparação do trabalho para submissão

**Texto e formato dos arquivos:** o artigo deve ser digitado em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3 cm de margem (superior, inferior, esquerda, direita), **diagramado conforme arquivo modelo anexo**. Artigos não diagramados ou diagramados incorretamente não serão aceitos. O arquivo eletrônico deverá ser compatível com *Word for Windows*. **O artigo pode ser escrito em português, inglês ou espanhol.**

**Tamanho do artigo:** O artigo submetido, incluindo as ilustrações e as referências, deverá apresentar no máximo 20 páginas (artigo de revisão), 06-12 páginas (artigo científico), 05 páginas (relato de caso), 05 páginas (comunicação), 05 páginas (nota técnica).

### 2. Seção de um manuscrito científico

**Artigo de revisão:** Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Desenvolvimento do assunto (organizado em partes com títulos próprios e, eventualmente, subtítulos); Considerações finais; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. As referências devem conter no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

### **3. Descrição das seções de um artigo científico (os demais tipos de manuscritos devem se adaptar ao modelo)**

**Título:** O título deve ser sucinto, mas representativo do conteúdo do artigo. Apenas a primeira palavra do título com a inicial em maiúscula (exceção para nomes próprios). A citação de suporte financeiro deverá ser colocada junto dos agradecimentos, antes da lista de referências. **Título em português/inglês/espanhol, negrito, centralizado, Times New Roman 12.**

**Título em inglês/português:** Logo abaixo do título em português, versão em inglês do título em português. **Título em inglês/português, itálico, centralizado, Times New Roman 10, sem espaçamento com o título.**

**Autor(es):** Os nomes dos autores virão abaixo dos títulos em português e inglês, na ordem direta, por extenso. A afiliação de cada autor deverá ser indicada por algarismos arábicos sobrescritos no final do sobrenome. Nome(s) completo(s), negrito, centralizado, número da filiação sobrescrito, Times New Roman 10.

**Afiliação(ões):** Deve ser citada somente a instituição principal e um segundo nível de filiação, quando da execução do trabalho submetido, seguida da cidade, estado e país. Não citar título, cargo e função. O autor para correspondência deve ser indicado com endereço completo, telefone, fax e e-mail. Endereço(s) de filiação: centralizado, número da filiação sobrescrito, Times New Roman 9.

**Resumo:** Narrativa sucinta dos objetivos, material e métodos (quando pertinente), principais resultados e conclusões, limitado a 200 palavras (1374 caracteres com espaço) em um só parágrafo. **Resumo – palavra em português, centralizado, negrito, Times New Roman 10. Resumo - texto: em português, justificado, parágrafo único, Times New Roman 10.**

**Palavras-chave:** Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo, não ultrapassando o limite de cinco. **Palavras-chave em negrito: demais palavras justificadas a esquerda, Times New Roman 10.**

**Abstract:** Versão em inglês do Resumo. Abstract - palavra: inglês, centralizado, negrito, Times New Roman 10. Abstract texto: inglês, justificado, itálico, Times New Roman 10.

**Keywords:** Versão em inglês das Palavras-chave. Keywords – palavra em negrito: demais palavras em inglês, itálico, justificadas a esquerda, máximo 5 palavras, Times New Roman 10.

**Introdução:** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho. Títulos - palavra: português, negrito, centralizado, Times New Roman 10. Texto justificado, espaçamento simples, Times New Roman 10.

**Material e Métodos:** Devem ser citados o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. É recomendado o uso restrito de subtítulos. Nos artigos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados, deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança. Títulos: português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

**Resultados:** Devem ser apresentados clara e objetivamente os principais resultados encontrados. **Resultados – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

**Discussão:** Devem ser discutidos somente os resultados obtidos no trabalho. **Discussão – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

**Conclusões:** As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada. **Conclusões – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

**Considerações finais:** devem ser utilizadas para revisões de literatura, relatos de caso, Nota Técnica. **Considerações Finais – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

**Agradecimentos:** Devem ser concisamente expressados. **Agradecimentos – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

**Referências:** Referenciar somente artigos citados e publicados. As referências devem ser listadas em ordem alfabética do(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) e a seguir do título. **Referências – palavra em português, negrito, centralizado, espaçamento simples, Times New Roman 10, ver instruções abaixo.**

**Ilustrações:** Compreende tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data), e a correspondente referência deve figurar na lista final. Recomendações: 1) Ilustrações idênticas ao original: os autores devem encaminhar à RBRA a autorização do autor ou detentor dos direitos autorais para reprodução. No artigo, além da identificação da fonte, os autores devem mencionar a autorização nos agradecimentos; 2) Ilustrações adaptadas ou modificadas: os autores devem identificar a fonte, acrescentando a informação "adaptado de ...".

**Tabela:** Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais apenas na separação do cabeçalho e ao final da tabela. A separação de grupos de dados no corpo da tabela deverá ser feita inserindo-se uma linha em branco. A legenda, colocada acima da tabela, recebendo inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo

arábico, e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. **Tabela em português, centralizada, Times New Roman 10.**

**Figura:** Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda deverá ser colocada abaixo da ilustração, recebendo inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Fig., mesmo quando se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.tif, com alta resolução. **Figuras em português, centralizada, Times New Roman 10.**

#### **4. Normas para citação no texto e redação de referências**

**Citação de referência no texto:** A citação no texto será feita segundo as circunstâncias, podendo o(s) autor(es) e as data(s) ser(em) citado(s) entre parênteses, ou somente a data. No caso de citação de diversos autores, listar cronologicamente e, havendo coincidência de data, usar a ordem alfabética de autor. Exemplo: Dunne (1967), Morril (1967), Nutrient... (1968), Lopes e Moreno (1974) Ferguson et al. (1979), **OU** (Dunne, 1967; Morril, 1967; Nutrient..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

#### **5. Referências**

São adotadas as normas da ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos abaixo. Para documentos não exemplificados usar a norma original ([www.abnt.org.br](http://www.abnt.org.br)).

#### PERIÓDICOS

**Anuário Estatístico do Brasil.** Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

**Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL .** Studies on Immunity to alphaviruses in foals. *Am J Vet Res*, v.40, p.5-10, 1979.

**Holenweger JA, Tagle R, Wasserman A, Schim FA, Franckel S** . Anestesia geral del canino. *Not Med Vet* , n.1, p.13-20, 1984.

#### PUBLICAÇÃO AVULSA

**Dunne HW** lang=EN-US (Ed.). lang=ES-TRAD *Enfermedades del cerdo* lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967.

**Lopes CAM, Moreno G**. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

**Morril CC**. Infecciones por clostrídios. In: Dunne HW (Ed.). lang=ES-TRAD *Enfermedades del cerdo* lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967. lang=ES-TRAD p.400-415.

**Nutrient** requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. p.19-20.

**Silva NQ**. *Peritoniaoscopia na égua*. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1971.

#### DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

Documento publicado disponibilizado em meio eletrônico

**Arranjo** tributário. *Diário do Nordeste On Line*, Fortaleza, 27. nov. 1998. Disponível em <http://www.diariodonordeste.com.br>. Acesso em 28 nov. 1998.

**Guncho MR**. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. *Anais ...* Fortaleza: Tec Treina, 1998. CD-ROM.

**Política.** In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em <http://www.priberam.pt/dIDPLO>. Acesso em 8 mar. 1999.

**Quality** food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2000.

**Silva RN, Oliveira R.** Os limites pedagógicos do paradigma style='letter-spacing:.2pt'>da qualidade total na educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. Anais eletrônicos ... Recife: UFPe, 1996. Disponível em <http://www.prospeq.ufpe.br /anais/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em 21 jan. 1997.

#### DOCUMENTO DE ACESSO EXCLUSIVO EM MEIO ELETRÔNICO

**Birds** from Amapá; banco de dados. Disponível em <http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>. Acesso em 25 nov. 1998.

**Bioline** Discussion List. List maintained by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: [lisserv@bdt.org.br](mailto:lisserv@bdt.org.br). Acesso em 25 nov. 1998.

**Civitas.** Coordenação de Simão Pedro Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: [gcsnet.com.br/oamis/civitas](http://gcsnet.com.br/oamis/civitas)>. Acesso em 27 nov. 1998.

#### CITAÇÃO DE CITAÇÃO

Devem ser evitadas. Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguido da expressão "citado por" e do autor e data da obra consultada.

#### ARTIGOS NO PRELO

Incluir na lista de referências apenas os artigos já aceitos para publicação. Após a referência, colocar a informação "No prelo". Os artigos apenas submetidos entram na categoria "Informação pessoal".

### INFORMAÇÃO PESSOAL

Os dados obtidos por informação oral (palestras, debates, artigos submetidos e em fase de análise, comunicação pessoal etc.) são identificados apenas no texto. Após a informação, coloca-se o autor, a data, instituição do autor e a expressão "Informação pessoal".

### **6. Informações complementares**

Não serão fornecidas separatas. Os artigos são disponibilizados no formato pdf, no endereço eletrônico da revista ([www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)).

A reprodução e a tradução de qualquer artigo para fins comerciais são proibidas, sendo que transcrição em outras revistas científicas deve ser precedida de anuência do editor.