



ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA DIAFANIZAÇÃO DE PEIXES NATIVOS

Maria Clara Rosa Silva¹ – Unifesspa
popclaraq7@gmail.com
Diógenes Henrique de Siqueira-Silva² - Unifesspa
diogenessilva@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: CNPq

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Biotecnologia, Ciências Biológicas

1. INTRODUÇÃO

Os peixes representam o maior grupo de espécies conhecidas entre os vertebrados, mais da metade - 33.000 espécies e contando - ocupando os mais diversos ambientes aquáticos, desde grandes altitudes até as profundezas marinhas, dentre as quais os peixes ósseos representam a maior parte das espécies descritas (Nelson, 2016). Além disso, os peixes têm se tornando um dos principais modelos biológicos, sendo que o primeiro registro de trabalhos utilizando esse grupo de vertebrados em experimentação data de 1966, com três artigos publicados. Esse número cresceu exponencialmente, e em 2015 foram encontrados 390 artigos nessa área (SCOPUS, 2019). Sendo assim, o conjunto de práticas relacionadas à reprodução de peixes é de suma importância para o dia a dia das pisciculturas e, para isso os caracteres sexuais secundários são cruciais, fornecendo informações importantes, como a sexagem das matrizes. Apesar do processo reprodutivo ser um dos aspectos mais estudados dentro do ciclo de vida dos peixes, o volume de informações disponíveis é bastante reduzido quando comparado ao número de espécies existentes. Um dos exemplos é o gênero *Moenkhausia* onde os caracteres propostos por Eigenmann, permanecem como os únicos diagnósticos para o gênero, sendo usados atualmente para definir as novas espécies dentro do gênero (BENINE et al. , 2004; GÉRY e ZARSKE, 2004; ZARSKE et al. , 2004; LIMA e BIRINDELLI, 2006; BERTACO e LUCINDA, 2006). A grande diversidade morfológica entre as espécies do gênero *Moenkhausia* tem levado à sugestão de que esse seja um grande grupo parafilético (FINK, 1974; COSTA, 1994; WEITZMAN e PALMER, 1997), por compartilhar diversas características com outros gêneros dentro da família Characidae. Embora, também seja possível que existam grupos naturais neste gênero (Benine,2004). Para a espécie *Moenkhausia oligolepis*, por exemplo, ainda não estão elucidadas informações sobre o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, como seus mecanismos de formação, variação e manutenção. No entanto, estudos, tais como sua Reprodução e desenvolvimento embrionário (Santos, 2019) e a análise das características seminais (Rodrigues, 2019) já foram realizados em nosso grupo com o objetivo de adicionar tais informações na literatura, e assim facilitar trabalhos futuros com a espécie estudada. O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de diafanização em *M. oligolepis*, elucidando caracteres sexuais secundários, auxiliando nos estudos reprodutivos e no esclarecimento das questões taxonômicas e de desenvolvimento ontogenético.

2. MATERIAS E MÉTODOS

¹Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

²PhD em Biologia Animal - Professor Adjunto da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACBIO/IESB/Unifesspa).

VI Seminário de Iniciação Científica

Pesquisa na Amazônia: Novos cenários

27, 29 e 30 de Outubro de 2020

On-line pela plataforma Google Meet

UNIFESSPA | PROPIT

Protocolo de diafanização piloto

Devido ao *M. oligolepis* ser um peixe selvagem, com reprodução em cativeiro dificultada, com captura limitada a época reprodutiva (meses de janeiro a fevereiro), utilizou-se, a princípio, como objeto de estudo para estabelecimento de protocolo de diafanização, a espécie *Poecilia reticulata* (lebiste), por ser um peixe domesticado, resistente, e que se reproduz com facilidade. Os espécimes foram anestesiados em solução de eugenol, fixados em solução de glutaraldeído e mantidos em solução de álcool 70%. As amostras fixadas foram diafanizadas e coradas de acordo com Taylor & Van Dyke (1985). Em seguida, foi feita a imersão do peixe em uma mistura de 10 mg de Azul de Alcian 8GX em 80 ml de álcool etílico por 48 horas para coloração da cartilagem. Posteriormente, foram feitas séries de lavagem de no mínimo 3 horas cada, em álcool a 95%, 70%, 40% e 15%, respectivamente. Os animais foram postos em solução de 3 partes de borato de sódio para 7 partes de água e mantidos durante 2 dias em temperatura alta (34°C) ao abrigo da luz solar. Por não apresentar resultados satisfatórios foi feita uma nova solução contendo maior taxa de borato de sódio (3 g) e mantidos durante 3 dias. Logo após, os espécimes foram transferidos para uma solução com KOH e Alizarina durante 2 dias. Antes da diafanização, com o auxílio de pinça de ponta fina e agulhas cirúrgicas, os exemplares tiveram os olhos retirados para facilitar a visualização de estruturas internas.

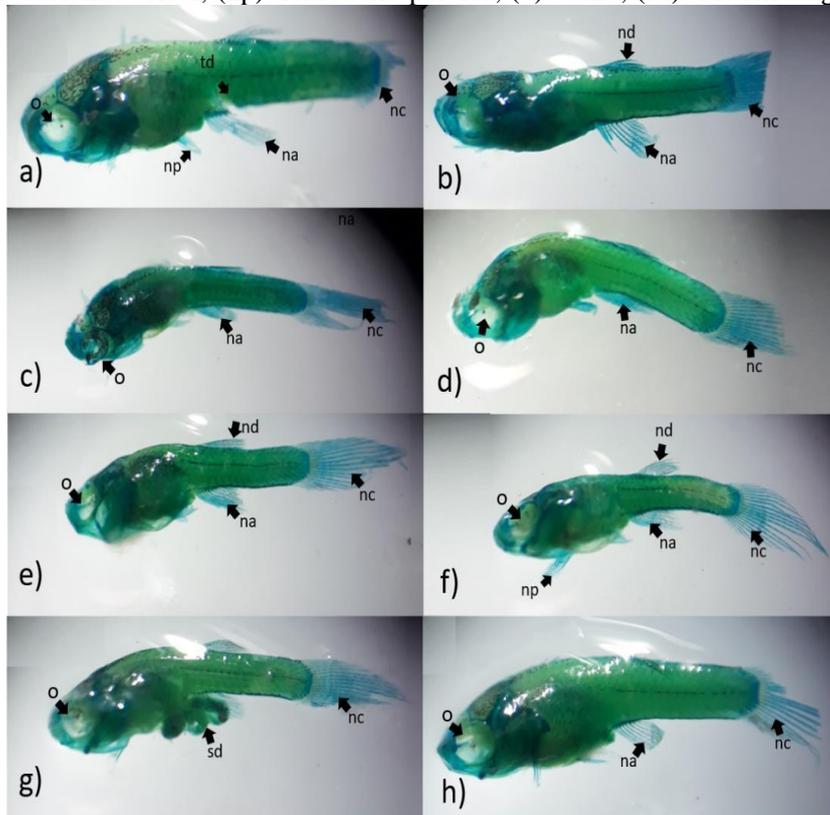
Técnica modificada de dupla coloração (Tripsina modificada para papaína)

A espécie utilizada como objeto de estudo para a técnica modificada de dupla coloração foi a *Moenkhausia oligolepis*. Os espécimes foram anestesiados em solução de eugenol, fixados em solução de glutaraldeído e mantidos em solução de álcool 70%. As amostras fixadas foram diafanizadas e coradas de acordo com Dingerkus & Uhler (1977). Em seguida foram colocados em 100 ml de solução branqueadora por cinco horas (Água oxigenada 3%), posteriormente foram imersos em Corante Alcian Blue (100 ml) por duas horas. A desidratação do tecido foi realizada com diferentes concentrações de álcoois, cada um com duração de uma hora, a partir da concentração mais alta (96%) para as mais baixas, 96%, 96%, 75%, 40% e 15%, respectivamente. Os indivíduos foram imersos em água destilada por 5 a 10 minutos, e em seguida foram imersos em 100 ml da solução digestora (Papaína), esta solução foi obtida usando 3,5 g de sementes de mamão verde maceradas, misturada com 95 ml de água destilada e 1 g de borato de sódio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo do protocolo era deixar as amostras translúcidas, mostrando apenas a estrutura óssea. No entanto, ao analisar a Figura 1, pode-se notar que o tecido muscular das larvas continuou intacto, provavelmente devido a não digestão pelo borato de sódio, o que impossibilitou a visualização da estrutura óssea. Como apresentado na Figura 1, muitas estruturas estão em desenvolvimento, sendo, por isso, ainda muito pequenas e/ou fracamente coradas. Além disso, conforme indivíduos aumentam de tamanho, torna-se mais difícil focar todas os planos de interesse numa mesma foto, tornando algumas estruturas de difícil visualização.

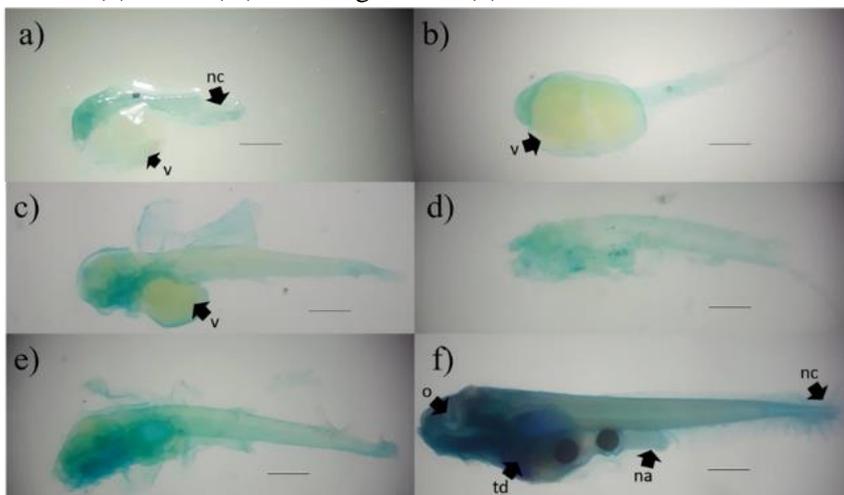
Figura 1. Desenvolvimento em larvas de *Poecilia reticulata*. Espécimes diafanizados e corados com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. (na): Nadadeira anal; (nc): Nadadeira caudal; (nd): Nadadeira dorsal; (np): Nadadeira pélvica; (o): Olho; (sd): Sistema digestório; (td): Tecido digerido



Fonte: autor

O segundo protocolo também não foi satisfatório e digeriu órgãos importantes (total ou parcialmente).

Figura 2: Larvas de *M. oligolepis* diafanizadas. (na): nadadeira anal; (nc): nadadeira caudal; (o): olho; (td): trato digestório; (v): vitelo.





Além da digestão total (Fig. 2d; 2e) do espécime, alguns indivíduos tiveram a nadadeira caudal digerida parcialmente (Fig. 2a; 2b.).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pôde-se notar que o tecido muscular das larvas continuou intacto, provavelmente devido a não digestão pelo borato de sódio, o que impossibilitou a visualização da estrutura óssea. Muitas vezes estruturas, principalmente ósseas, quando visualizadas pela primeira vez, geralmente estão começando seu desenvolvimento, sendo, por isso, ainda muito pequenas e/ou fracamente coradas. Além disso, conforme indivíduos aumentam de tamanho, torna-se mais difícil focar todas os planos de interesse numa mesma foto, sendo que algumas estruturas, embora presentes, não são visualizadas por questões de foco. Novos protocolos serão testados a fim de conseguirmos a correta visualização das estruturas.

5. REFERÊNCIAS

- BRAZ DE ARAUJO, Renato. Desova e fecundidade em peixes de água doce e marinhos. Revista de Biologia e Ciências da Terra [Internet], 9 (2):24-31, 2009.
- CORONADO, J. 2014. Elaboración de material docente mediante la técnica de diafanización para la enseñanza de la morfogénesis ósea. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de maestría. 116 pp.
- DINGERKUS, G. y L. Uhler. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. Stain Technology. USA. 52:229-232.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. Fishes of the World. Canadá, New Jersey. Ed. Fifth Edition. 2016.
- RODRIGUES, J. R. Caracterização seminal de *Moenkhausia oligolepis* (GÜNTHER, 1864). 2019, 39f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - IESB/ Faculdade de Biologia, UNIFESSPA, 2019.
- SANTOS, R. S. Reprodução e desenvolvimento embrionário do lambari do olho de fogo *Moenkhausia oligolepis* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) em condições de cativeiro. 2019, 59f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - IESB/ Faculdade de Biologia, UNIFESSPA, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12861-018-0166-4>.
- VAZZOLER, A. E. A. M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá; São Paulo: SBI. 1996
- WOLTERING, J. M.; HOLZEM, M; SCHNEIDER, R. F.; NANOS, V.; MEYER, A. The skeletal ontogeny of *Astatotilapia burtoni* – a direct-developing model system for the Evolution and development of the teleost body plan. BMC Developmental Biology (2018) 18:8