

ESTUDO DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA PIGMENTAÇÃO DA CRISTA NEURAL DE DUAS VARIETADES DE TILÁPIA NILÓTICA (*OREOCHROMIS NILOTICUS* VAR. RED-STIRLING E VAR. CHITRALADA) E SEU HÍBRIDO UTILIZANDO TÉCNICAS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Gustavo Botton Zagolin¹; José Xavier Neto²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: gustavozagolin@yahoo.com.br¹

Professor da Universidade de São Paulo; e-mail: xavier.neto@incor.usp.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br³

Área do Conhecimento: Biologia do Desenvolvimento

Palavras-chave: Crista neural; Pigmentação; Melanócitos; Tilápia; Red Stirling

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, estudos sobre o padrão de pigmentação em várias espécies de vertebrados têm levantado uma série de interessantes descobertas sobre as células da pigmentação. Técnicas de marcação celular têm evidenciado o comportamento da migração das células da crista neural no processo de embriogênese. As células da crista neural fazem parte da ectoderme e são induzidas nas bordas da placa neural, a partir daí, elas migram para pontos específicos no organismo, se diferenciando nos seguintes tipos celulares, neurônios, células da glia, sistema nervoso periférico, músculo liso, cartilagens, algumas células dos ossos do crânio e as da pigmentação (LE DOUARIN *et al.*, 2004). O estudo do desenvolvimento dos melanócitos em organismos modelos tem sido fundamental para o entendimento e tratamento de doenças que envolvam melanócitos humanos, tais como, o vitiligo, piebaldismo, Síndrome de Waardenburg e melanoma (NORDLUND *et al.*, 2006). Com a descoberta de mutações no padrão de pigmentação do zebrafish *Danio rerio* e do camundongo *Mus musculus*, os estudos com padrões de pigmentação em sistemas modelos puderam se intensificar. A tilápia vermelha é um mutante descoberto em Taiwan em 1968. Em 1979, o pesquisador Fitzgerald, realizando cruzamentos seletivos entre mutantes fêmeas alaranjadas de *Oreochromis mossambicus* com machos de *Oreochromis niloticus* conseguiu produzir tilápias vermelhas, semelhantes àquelas encontradas em Taiwan (BEHRENDTS *et al.*, 1982). De modo geral, a coloração dos peixes é constituída por uma interação de cromatóforos que estão localizados no *stratum spongiosum* da derme. Essas células são classificadas conforme o seu pigmento: melanóforos (marrom ou preto), eritróforos (vermelho), xantóforos (amarelo), que se distribuem em todo o corpo do peixe. Os leucóforos e iridóforos se concentram na parte ventral essas células não possuem pigmento, apenas cristais de guanina que resultam na coloração branca e prateada da região. Os cristais dos leucóforos são pequenos e móveis já os iridóforos possuem cristais grandes e incapazes de se moverem. É importante citar que muitas vezes em um mesmo cromatóforo é observado mais de um pigmento. O fenótipo “vermelho” em tilápias parece mais ser o resultado de uma falha, durante a formação dos melanóforos no período de desenvolvimento embrionário do que alguma deficiência na síntese de melanina nos melanossomos. Isto pode ser confirmado pela presença de melanina na retina, rins e baço, bem como, nas chamadas áreas manchadas, presentes na pele de alguns tipos, os quais mostram melanóforos maiores e mais difusos que os dos tipos selvagens, que possuem coloração escura e listras transversais. Exames histológicos

realizados em exemplares de *Oreochromis niloticus* amarelos mostraram o desenvolvimento incompleto de melanóforos e cromatóforos (McANDREW, 1988). A coloração vermelha obtida através do cruzamento de tilápias das espécies *Oreochromis mossambicus* e *Oreochromis niloticus*, é resultante da interação alélica parcialmente dominante em um mesmo *locus*. Em tilápias da espécie *Oreochromis mossambicus* a coloração preta é dominante sobre a vermelha, enquanto que em *Oreochromis niloticus* a coloração preta é recessiva em relação à vermelha (AVTALION & REICH, 1989). O cruzamento intraespecífico de *Oreochromis niloticus* entre a variedade vermelha Red-Stirling e a variedade selvagem Chitralada (escura) resulta em uma prole 100% vermelha, porém, com padrões de manchas que aparentemente pode ser explicado por uma penetrância completa e uma expressividade variável de um segundo *locus* gênico que controla este fenótipo.

OBJETIVOS

Avaliar os padrões de migração celular da crista neural da tilápia, *Oreochromis niloticus*, variedades Red-Stirling, Chitralada e da progênie do cruzamento entre as duas variedades utilizando técnicas de imunohistoquímica, com o anticorpo HNK-1 marcador de células da crista neural; Comparar os padrões de migração das células de pigmentação, das três variedades.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido na Estação de Piscicultura de Ponte Nova em Salesópolis, no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) do Núcleo de Integrado de Biotecnologia, da Universidade de Mogi das Cruzes e no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, no Instituto do Coração (INCOR) São Paulo. As variedades de tilápias que foram utilizadas no experimento são: a *Oreochromis niloticus* variedade Red-Stirling (vermelha), Chitralada (selvagem), e a progênie do cruzamento destas duas. A primeira foi desenvolvida na Universidade de Stirling – Escócia e a segunda na Tailândia. Os animais foram acondicionados em tanques de concreto na Piscicultura de Ponte Nova na proporção de 1 macho para 3 fêmeas, onde eram checados 2 vezes por semana para coleta de ovos na cavidade bucal da fêmeas. Ao término desse procedimento os zigotos eram colocados em uma incubadora desenvolvida no LAGOAA, que reproduz o movimento giratório que a fêmea da tilápia faz com a boca para incubar os ovos. Então, os ovos foram fixados com paraformaldeído à 4% por 2h e conservados em PBS 1X à 4°C, nos estágios 12, 13 e 15. Na imunohistoquímica os embriões previamente fixados foram bloqueados com: 10% *sheep serum*, PBS 1X, 2% saponina e 0,2% de soro de Albumina Bovina Fetal por 1 hora no termino do bloqueio, os embriões foram lavados 2 vezes com PBS 1X, então foi colocado o anticorpo primário HNK – 1 (1:50) em solução de bloqueio por 8 horas a 4°C. Novamente será lavado com PBS 1X por duas vezes e bloqueado por mais 15 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário ALEXA (1:200) com solução de bloqueio por 8 horas, ao término foram lavados com PBS 1X, e revelados em um microscópio de fluorescência. Esses experimentos mostraram que a ausência de pigmentação escura em tilápias vermelhas é devido a uma falha na produção de melanina ou uma interrupção na diferenciação dos cromatóforos oriundos da crista neural.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados experimentos utilizando o anticorpo primário HNK-1 com o anticorpo secundário Alexa 488 goat anti-mouse IgG, o qual não apresentou resultado satisfatório

pois o anticorpo Alexa não interagiu com o anticorpo primário HNK-1. Novos experimentos foram feitos com a variedade Tailandesa agora substituindo o anticorpo secundário IgG, pelo Alexa 488 goat anti-mouse IgM, no qual foi obtido resultados satisfatórios, como observado na figura 1, que mostra a fluorescência nas células da crista neural.

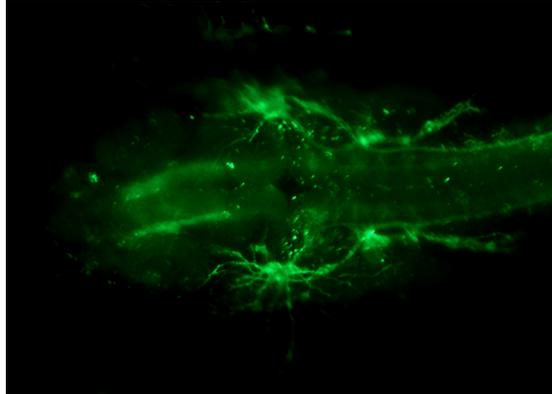


Figura – 1: marcação imunohistoquímica das células da crista neural.

Novos experimentos serão necessários para a comparação da crista neural na outras duas variedades.

CONCLUSÕES

Com os experimentos realizados obteve-se um bom método de marcação das células da crista neural para tilápias *Oreochromis niloticus*, mas para a comparação das células da pigmentação das três variedades será necessária a realização do experimento em cada variedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVTALION, R.R. & REICH, L. Chromatophore inheritance in red tilapia. **Bamidgeh**, v.41, p.98-104, 1989.

BEHRENDTS, L.L.; NELSON; R.G., SMITHERMAN, R.O.; STONE N.M. breeding and culture of red-gold colour phase in tilapia. **J. Word Mariculture**, v.13, p.210-220, 1982.

LE DOUARIN, N.M.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN E. Neural crest cell plasticity and its. **Development**. v.131, p.4637-4650, 2004.

NORDLUND, J.J.; BOISSY, R.E.; HEARING, V.J.; KING, R.A.; OETTING, W.S.; McANDREW, B.J. The genetics and histology of red, blond and associated colour variants in *Oreochromis niloticus*. **Genetica**, v.76, p.127-137, 1988.