Junielson Soares da Silva
Denise dos Santos Vila Verde
Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Isaquiel de Moura Ribeiro Azevedo
Organizadores

Wissen editora
2025

PESQUISAS EM CITOLOGIA, GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR: ASPECTOS GERAIS

Volume 2

Junielson Soares da Silva
Denise dos Santos Vila Verde
Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Isaquiel de Moura Ribeiro Azevedo
Organizadores

Wissen editora
2025

PESQUISAS EM CITOLOGIA, GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR:
ASPECTOS GERAIS

Volume 2

Junielson Soares da Silva
Denise dos Santos Vila Verde
Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Isaquiel de Moura Ribeiro Azevedo
Organizadores

Pesquisas em Citologia, Genética e Biologia Molecular: aspectos gerais

Volume 2

Teresina-PI, 2025

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

©2025 *by* Wissen Editora
Copyright © Wissen Editora
Copyright do texto © 2025 Os autores
Copyright da edição © Wissen Editora
Todos os direitos reservados

Direitos para esta edição cedidos pelos autores à Wissen Editora.

Todo o conteúdo desta obra, inclusive correção ortográfica e gramatical, é de responsabilidade do(s) autor(es). A obra de acesso aberto (Open Access) está protegida por Lei, sob Licença Creative Commons Atribuição-Não Comercial-Sem Derivações 4.0 Internacional, sendo permitido seu *download* e compartilhamento, desde que atribuído o crédito aos autores, sem alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Editores-Chefes: Dr. Junielson Soares da Silva
Ma. Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Dra. Denise dos Santos Vila Verde
Dra. Adriana de Sousa Lima

Projeto Gráfico e Diagramação: Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira

Imagem da Capa: Canva

Edição de Arte: Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira

Revisão: Os autores
Os Organizadores

Informações sobre a Editora
Wissen Editora
Homepage: www.editorawissen.com.br
Teresina – Piauí, Brasil
E-mails: contato@wisseneditora.com.br
wisseneditora@gmail.com

Siga nossas redes sociais:
@wisseneditora

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

EQUIPE EDITORIAL

Editores-chefes

Dr. Junielson Soares da Silva
Ma. Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Dra. Denise dos Santos Vila Verde
Dra. Adriana de Sousa Lima

Equipe de arte e editoração

Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira

CONSELHO EDITORIAL

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Dr. Felipe Górski - Secretaria de Educação do Paraná (SEED/PR)
Dra. Patrícia Pato dos Santos - Universidade Anhanguera (Uniderp)
Dr. Jose Carlos Guimaraes Junior - Governo do Distrito Federal (DF)

Ciências Biológicas e da Saúde

Dra. Francijara Araújo da Silva - Centro Universitário do Norte (Uninorte)
Dra. Rita di Cássia de Oliveira Angelo - Universidade de Pernambuco (UPE)
Dra. Ana Isabelle de Gois Queiroz - Centro Universitário Ateneu (UniAteneu)

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Dr. Allan Douglas Bento da Costa - Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)
Dra. Vania Ribeiro Ferreira - Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)
Dr. Agmar José de Jesus Silva – Secretaria de Educação do Amazonas (Seduc/AM)

Linguística, Letras e Artes

Dra. Conceição Maria Alves de A. Guisardi - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Dr. Isael de Jesus Sena - Culture, Education, Formation, Travail (CIRCEFT)
Dra. Mareli Eliane Graupe - Universidade do Planalto Catarinense (Uniplac)
Dr. Rodrigo Avila Colla - Rede Municipal de Ensino de Esteio, RS
Dr. Erika Giacometti Rocha Berribili - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Dr. Douglas Manoel Antonio De Abreu P. Dos Santos - Universidade de São Paulo (USP)
Dra. Aline Luiza de Carvalho - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG)
Dr. José Luiz Esteves - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR)
Dr. Claudemir Ramos - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC/SP)
Dr. Daniela Conegatti Batista – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Dr. Wilson de Lima Brito Filho - Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Dr. Cleonice Pereira do Nascimento Bittencourt- Universidade de Brasília (UnB)
Dr. Jonata Ferreira de Moura - Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Dra. Renata dos Santos - Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI)

Conselho Técnico Científico

Me. Anderson de Souza Gallo - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ
Ma. Antônia Alikaene de Sá - Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Ma. Talita Benedcta Santos Künast - Universidade Federal do Paraná (UFPR)
Ma. Irene Suelen de Araújo Gomes – Secretaria de Educação do Ceará (Seduc /CE)
Ma. Tamires Oliveira Gomes - Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)
Ma. Aline Rocha Rodrigues - União Das Instituições De Serviços, Ensino E Pesquisa LTDA (UNISEPE)
Me. Mauricio Pavone Rodrigues - Universidade Cidade de São Paulo (Unicid)
Ma. Regina Katiuska Bezerra da Silva - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Esp. Rubens Barbosa Rezende – Faculdade UniFB
Me. Luciano Cabral Rios – Secretaria de Educação do Piauí (Seduc/PI)
Me. Jhenys Maiker Santos - Universidade Federal do Piauí (UFPI0
Me. Francisco de Paula S. de Araujo Junior - Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Ma. Anna Karla Barros da Trindade - Instituto Federal do Piauí (IFPI)
Ma. Elaine Fernanda dos Santos - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Ma. Lilian Regina Araújo dos Santos - Universidade do Grande Rio (Unigranrio)
Ma. Luziane Said Cometti Lélis - Universidade Federal do Pará (UFPA)
Ma. Márcia Antônia Dias Catunda - Devry Brasil
Ma. Marcia Rebeca de Oliveira - Instituto Federal da Bahia (IFBA)
Ma. Mariana Morais Azevedo - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Ma. Marlova Giuliani Garcia - Instituto Federal Farroupilha (IFFar)
Ma. Rosana Maria dos Santos - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
Ma. Rosana Wichineski de Lara de Souza - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Ma. Simone Ferreira Angelo - Escola Família Agrícola de Belo Monte - MG
Ma. Suzel Lima da Silva - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Ma. Tatiana Seixas Machado Carpenter - Escola Parque
Me. Cássio Joaquim Gomes - Instituto Federal de Nova Andradina / Escola E. Manuel Romão
Me. Daniel Ordane da Costa Vale - Secretaria Municipal de Educação de Contagem
Me. Diego dos Santos Verri - Secretária da Educação do Rio Grande do Sul
Me. Fernando Gagno Júnior - SEMED - Guarapari/ES
Me. Grégory Alves Dionor - Universidade do Estado da Bahia (UNEB)/ Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Me. Lucas Pereira Gandra - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); UNOPAR, Polo Coxim/MS
Me. Lucas Peres Guimarães – Secretaria Municipal de Educação de Barra Mansa - RJ
Me. Luiz Otavio Rodrigues Mendes - Universidade Estadual de Maringá (UEM)
Me. Mateus de Souza Duarte - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Me. Milton Carvalho de Sousa Junior - Instituto Federal do Amazonas (IFAM)
Me. Sebastião Rodrigues Moura - Instituto Federal de Educação do Pará (IFPA)
Me. Wanderson Diogo A. da Silva - Universidade Regional do Cariri (URCA)

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Ma. Heloisa Fernanda Francisco Batista - Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Ma. Telma Regina Stroparo - Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro)
Me. Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Pesquisas em Citologia, Genética e Biologia Molecular: aspectos gerais

Volume 2

http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Pesquisas em citologia, genética e biologia molecular [livro eletrônico]: aspectos gerais: volume 2 / organização Junielson Soares da Silva... [et al.]. -- 2. ed. -- Teresina, PI: Wissen Editora, 2025.
PDF

Vários autores.
Outros organizadores: Denise dos Santos Vila Verde, Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira, Isaquiel de Moura Ribeiro Azevedo.
Bibliografia.
ISBN 978-65-85923-34-7
DOI: 10.52832/wed.130

1. Biologia molecular 2. Citologia 3. Genética I. Silva, Junielson Soares da. II. Vila Verde, Denise dos Santos. III. Oliveira, Neyla Cristiane Rodrigues de. IV. Azevedo, Isaquiel de Moura Ribeiro.

25-246705 CDD-572.8

Índices para catálogo sistemático:

1. Biologia molecular 572.8

Aline Graziele Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129

Informações sobre da Wissen Editora
Homepage: www.editorawissen.com.br
Teresina - Piauí, Brasil
E-mails: contato@wisseneditora.com.br
wisseneditora@gmail.com

Como citar ABNT: SILVA, J. S. da S. *et al.* **Pesquisas em Citologia, Genética e Biologia Molecular: aspectos gerais**. v. 2, Teresina-PI: Wissen Editora, 2025. 118 p. DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Teresina-PI, 2025

SOBRE OS ORGANIZADORES

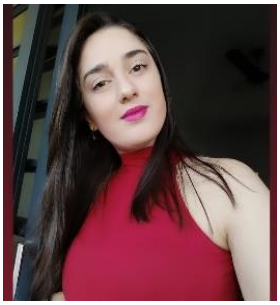
Junielson Soares da Silva

Mestre e doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv), pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí, onde participou do Pibid. Especialista em Saúde Pública, e em Educação Ambiental pelo Instituto Superior de Educação São Judas Tadeu-ISESJT. Vem estudando o efeito tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico de substâncias derivadas de plantas em mosquitos vetores de arboviroses (*Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*). Tem experiência em metodologia de Ensino de Ciências da Natureza (Ciências e Biologia) e Formação de Professores. É editor-chefe de revistas científicas (Journal of Education, Science and Health JESH, Journal of Research in Medicine and Health JORMED, Revista Ensinar - RENSIN e Revista Base Científica) e da Wissen Editora.

Denise dos Santos Vila Verde

Graduada em Engenharia Florestal pela UFRB, com experiência como bolsista Fapesb em ciência do solo (2014 - 2015). Bolsista Fapesb/CNPq no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, focando em micropropagação de citros, mandioca, inhame e mamão (2015 - 2018). Mestre em Ciências Agrárias pela UFRB, pesquisando conservação in vitro de germoplasma de inhame na Embrapa (2020), como bolsista Capes. Doutora em Produção Vegetal na UESC, como bolsista Capes, desenvolvendo minha tese com indução de haploides e polipoides em citros, além de contribuir com outros trabalhos da cultura e de mandioca, mamão e inhame. Além disso, atuo como professora conteudista/autora desde 2023 na Delinea EDTECH, desenvolvendo materiais didáticos para disciplinas como Hidrologia, Irrigação e Drenagem, Fruticultura, Extensão Rural, e também em oficinas voltadas para a indústria sucroalcooleira e regulamentos de operação de prensa. Também desempenho um papel ativo na organização de eventos, especialmente como membro da Comissão Científica da Bio10 Digital Cursos, contribuindo para a coordenação e qualidade dos conteúdos apresentados.

Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira



Mestra em Desenvolvimento e Meio Ambiente (PRODEMA/UFPI). Membro do Grupo de Estudos e Pesquisas Ambientais do Maranhão, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (GEPAM/IFMA). Especialista em Ensino de Ciências pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI), Especialista em Ensino de Genética pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí (UFPI). Estagiária bolsista-CNPq na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte/Teresina, PI, adquirindo experiências na área de Ciência do Solo (coleta, manejo, propriedades químicas,

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

biológicas e fauna edáfica). Bolsista CAPES/UFPI (2019/2021) adquirindo experiências em Meio Ambiente, Ensino, Educação Ambiental e Mudanças Climáticas. Docente na Educação Básica e Ensino Superior, nas instituições: Escola Municipal Nossa Senhora da Conceição (EMNSC), Ensino Fundamental-Ciências (2015); Professora substituta EBTT de Biologia no IFMA/*Campus* Alcântara (2015-2017); Professora Substituta EBTT no IFPI/ *Campus* São João do Piauí (2021-2023). Editora-chefe das revistas científicas (Journal of Education, Science and *Health* –JESH, Revista Ensinar -RENSIN) e da *Wissen* Editora.

Isaquiel de Moura Ribeiro Azevedo

Mestrando no Programa de Ensino de Ciências, Matemática e Tecnologias pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Pós-graduado em Educação em Ciências e Matemática pelo Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) e em Ciências da Natureza, suas Tecnologias e o Mundo do Trabalho pela Universidade Federal do Piauí (UFPI). Graduado em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal do Piauí (IFPI), onde atuou no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Docência (PIBID), desenvolvendo atividades voltadas para o ensino de Ciências e Biologia. Também possui formação técnica em Redes de Computadores, com experiência na área de tecnologias, e forte interesse em temas como educação em Ciências, tecnologias educacionais, ensino de Bioquímica, ensino de Biologia, formação de professores e práticas educativas.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO 14

CAPÍTULO 1 16

MECANISMOS REGULATÓRIOS DA EXPRESSÃO GÊNICA NA ANGIOGÊNESE 16

Larissa Pereira Damasceno 16

João Marcos Oliveira da Silva 16

Hanna Karolina de Araujo Batistão 16

Carlos Vinicius Expedito de Souza 16

Vinicius Bernardo de Oliveira 16

Angel Mauricio Castro Gamero 16

DOI: 10.52832/wed.130.776 16

CAPÍTULO 2 27

INFLUÊNCIA DA VIA WNT CLÁSSICA NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL E ANGIOGÊNESE 27

Carlos Vinicius Expedito de Souza 27

João Marcos Oliveira da Silva 27

Hanna Karolina de Araujo Batistão 27

Larissa Pereira Damasceno 27

Vinicius Bernardo de Oliveira 27

Angel Mauricio Castro Gamero 27

DOI: 10.52832/wed.130.777 27

CAPÍTULO 3 37

CORANTES FLUORESCENTES NA CITOMETRIA DE FLUXO: MECANISMOS E APLICAÇÕES EM ANÁLISES CELULARES 37

Pedro Henrique Doleski 37

Douglas Gonçalves Friedrichs 37

DOI: 10.52832/wed.130.778 37

CAPÍTULO 4 46

ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS RESIDENTES DE ÓRGÃOS IMUNES PRIMÁRIOS, SECUNDÁRIOS E FÍGADO: METODOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES NA PESQUISA 46

Pedro Henrique Doleski 46

Willian Douglas dos Santos Rocha 46

DOI:10.52832/wed.130.779 46

CAPÍTULO 5 57

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PEIXES DOS AFLUENTES DA BACIA DO RIO MUNIM – MA 57

Luana da Silva Pereira 57

Elidy Rayane de Rezende França 57

Eline Silva Lima 57

Marcelo Silva de Almeida 57

Jordânia Letícia do Nascimento Silva 57

Maria Claudene Barros 57

Elmary da Costa Fraga 57

DOI:10.52832/wed.130.780 57

CAPÍTULO 6 77

MÉTODOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO UTILIZADOS NA AGRICULTURA 77

Alberto dos Reis Fialho 77

Alexsander Silva Alves 77

Arthur Aquino Chagas 77

Jorge Guilherme Costa Pecegueiro 77

José Sotero da Costa Neto 77

Veronica Carolina Matne Velasco 77

DOI:10.52832/wed.130.781 77

CAPÍTULO 7 89

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE PEIXES DA FAMÍLIA CURIMATIDAE (CHARACIFORMES) DA BACIA DO RIO ITAPECURU, MARANHÃO 89

Katiana Carvalho dos Santos 89

Eline Silva Lima **89**

Francisca Karoline Marinho Ferreira **89**

Maria Claudene Barros **89**

Elmary da Costa Fraga **89**

DOI:10.52832/wed.130.782 ..... **89**

CAPÍTULO 8 ..... **107**

FERRAMENTA DIGITAL NO ENSINO DE BIOLOGIA: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM MINICURSO DE CANVA **107**

Mário Jeová dos Santos **107**

Luana Lima Guimarães Alencar **107**

DOI:10.52832/wed.130.783 ..... **107**

APRESENTAÇÃO

Com grande satisfação apresentamos o segundo volume da obra "Pesquisas em Citologia, Genética e Biologia Molecular: aspectos gerais", uma coletânea que reúne avanços significativos nas áreas de Citologia, Genética e Biologia Molecular. O livro apresenta uma abordagem interdisciplinar e integra conhecimentos teóricos e práticos, evidenciando o impacto de pesquisas científicas desenvolvidas em diversas instituições brasileiras de renome.

Composto por oito capítulos, este volume explora uma ampla gama de temas. Alguns dos capítulos foram originados das discussões apresentadas no II Congresso Nacional de Citologia, Genética e Biologia Molecular On-line (II CONACIGEN) realizado em 2024 pela Bio10 Digital Cursos com apoio da Wissen Editora, reforçando o compromisso de disseminar resultados científicos de qualidade.

O Capítulo 1 aborda os "Mecanismos regulatórios da expressão gênica na angiogênese", tema essencial para a compreensão de processos biológicos e terapias relacionadas. O Capítulo 2 explora a "Influência da via WNT clássica na transição epitélio-mesenquimal e na angiogênese", destacando sua importância em processos fisiológicos e patológicos.

Avançando para técnicas laboratoriais, o Capítulo 3 detalha o uso de "Corantes fluorescentes na citometria de fluxo: mecanismos e aplicações nas análises celulares". O Capítulo 4 discute metodologias para "Isolamento de linfócitos residentes de órgãos imunológicos e fígado, enfatizando suas aplicações na pesquisa biomédica".

O enfoque em biologia molecular e genética de organismos é dado no Capítulo 5, que descreve a "Identificação molecular de peixes da bacia do rio Munim (MA)", e no Capítulo 7, que analisa as "Relações filogenéticas entre peixes da família Curimatidae da bacia do rio Itapecuru (MA)". Esses estudos contribuem para a conservação da biodiversidade e o manejo sustentável dos recursos naturais.

O Capítulo 6 aborda "Métodos de melhoramento genético aplicados à agricultura", destacando sua relevância para o aumento da produtividade e sustentabilidade no setor agrícola. Por fim, o Capítulo 8 avalia a eficácia de "Ferramentas digitais no ensino de Biologia, com foco na aplicação de um minicurso sobre o uso do Canva, demonstrando a integração entre tecnologia e educação".

Esta obra é destinada a estudantes, pesquisadores e profissionais das áreas de Biologia, Genética, Biotecnologia e afins, sendo uma referência para aqueles que buscam aprofundar seus

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

conhecimentos em citologia, genética e biologia molecular. Esperamos que o conteúdo apresentado inspire novas investigações e colabore para o avanço científico e educacional.

Parabenizamos aos autores dos capítulos pelo empenho e dedicação na realização dos trabalhos que deram origem aos estudos aqui publicados. Desejamos uma ótima leitura a todos!

Junielson Soares da Silva

Organizadores

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

CAPÍTULO 1

MECANISMOS REGULATÓRIOS DA EXPRESSÃO GÊNICA NA ANGIOGÊNESE

REGULATORY MECHANISMS OF GENE EXPRESSION IN ANGIOGENESIS

Larissa Pereira Damasceno
Estudante de Graduação em Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

João Marcos Oliveira da Silva
Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas-MG, Brasil

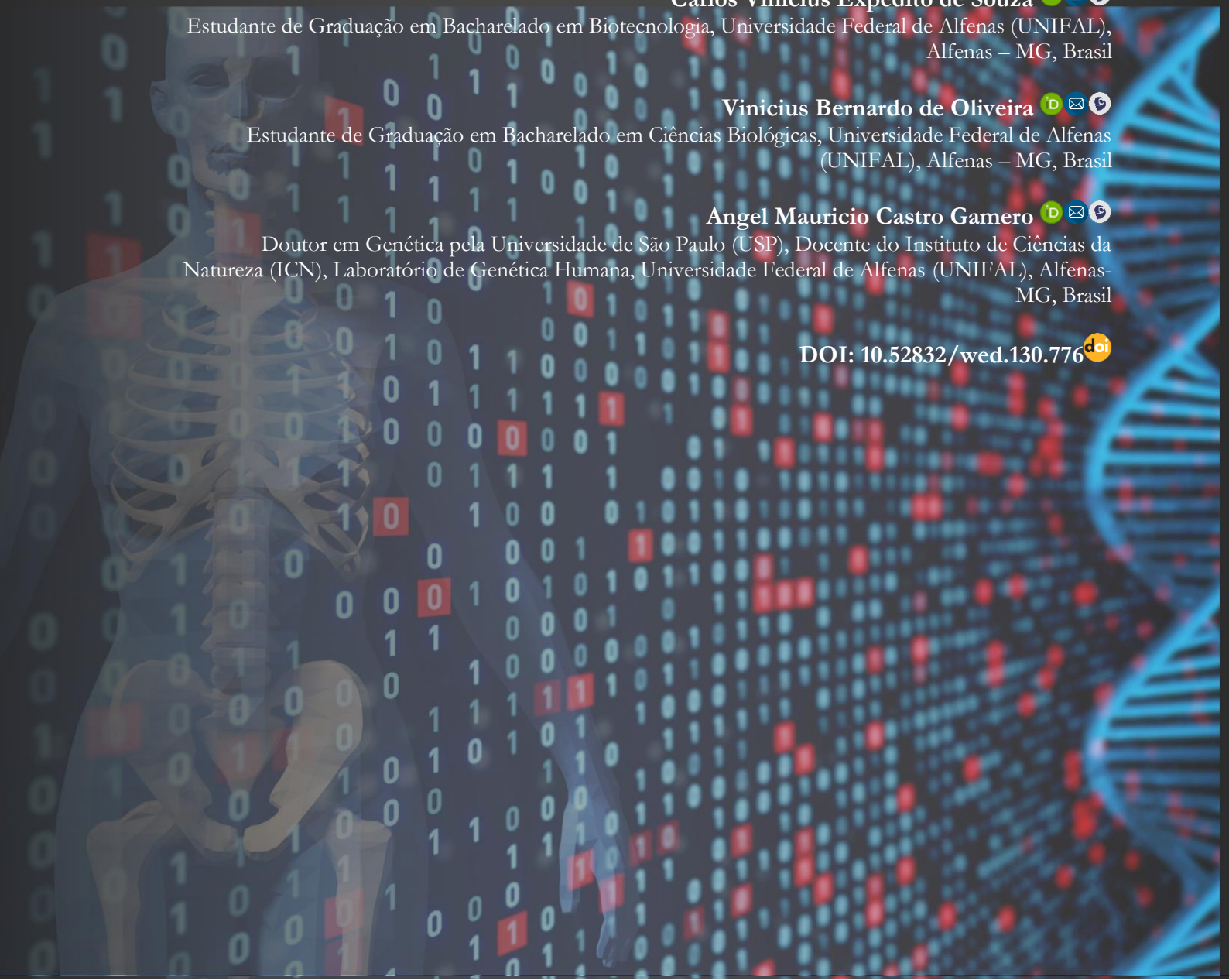
Hanna Karolina de Araujo Batistão
Graduada em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

Carlos Vinicius Expedito de Souza
Estudante de Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

Vinicius Bernardo de Oliveira
Estudante de Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

Angel Mauricio Castro Gamero
Doutor em Genética pela Universidade de São Paulo (USP), Docente do Instituto de Ciências da Natureza (ICN), Laboratório de Genética Humana, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas-MG, Brasil

DOI: 10.52832/wed.130.776



Resumo: A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, essencial para a homeostase do organismo. A angiogênese é desencadeada pela necessidade de nutrientes ou oxigênio, levando à ativação de células endoteliais adjacentes. Regulada por uma complexa rede de fatores de crescimento e citocinas, incluindo VEGF, FGFs, PGF, PDGF, TNF-α, TGF-β e angiopoietinas, a angiogênese envolve aumento da permeabilidade endotelial, vasodilatação, proliferação e migração de células endoteliais. Para compreender melhor os principais mecanismos moleculares das vias angiogênicas, este estudo compilou informações recentes, focando na regulação e expressão de genes. Observamos que transcritos como HIF-1α e NF-ϰB desempenham papéis cruciais na regulação da angiogênese. Além disso, modificações epigenéticas, como a metilação do DNA e modificações das histonas, também influenciam a expressão de genes angiogênicos. Ademais, esta revisão destaca a também importância dos mecanismos regulatórios para estabelecer ou melhorar tratamentos de doenças relacionadas à angiogênese.

Palavras-chave: Angiogênese. HIF-1α. Metilação. NF-Kb. Regulação gênica.

Abstract: Angiogenesis is the process of forming new blood vessels from pre-existing ones, essential for organismal homeostasis. Angiogenesis is triggered by the need for nutrients or oxygen, leading to the activation of adjacent endothelial cells. This process is regulated by a complex network of growth factors and cytokines, including VEGF, FGFs, PGF, PDGF, TNF-α, TGF-β, and angiopoietins. Angiogenesis involves increased endothelial permeability, vasodilation, proliferation, and migration of endothelial cells. To better understand the key molecular mechanisms of angiogenic pathways, this study compiled recent information, focusing on the regulation of gene expression. We observed that transcripts such as HIF-1α and NF-ϰB play crucial roles in regulating angiogenesis. Additionally, epigenetic modifications, such as DNA methylation and histone modifications, also influence the expression of angiogenic genes. Moreover, this review highlights the importance of regulatory mechanisms in establishing or improving treatments for angiogenesis-related diseases.

Keywords: Angiogenesis. HIF-1α. Methylation. NF-ϰB. Genetic regulation.

1 INTRODUÇÃO

A angiogênese é um processo fisiológico caracterizado pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (Teleanu *et al.*, 2020). Esse processo é de grande importância para a homeostase do organismo, essencial para o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, crescimento e reparo de tecidos. No entanto, a angiogênese também pode estar presente em condições patológicas, contribuindo para a progressão tumoral e doenças cardiovasculares (Kretschmer; Rüdiger; Zahler, 2021).

Regulada externamente, a angiogênese é principalmente modulada pela sinalização de um tecido ou órgão em resposta à oferta de oxigênio e nutrientes. Gradientes de estresse oxidativo por hipóxia também podem influenciar a angiogênese. Em resposta a esses estímulos, visando atingir a homeostase, ocorre a ativação e proliferação de células endoteliais adjacentes aos vasos

existentes. Estas células migram em direção ao estímulo angiogênico e formam novos capilares, dependendo criticamente de uma vasculatura funcional para sobreviver (Eelen *et al.*, 2020).

De forma mais ampla, a angiogênese resulta da interação entre células e citocinas, da matriz extracelular e de enzimas proteolíticas. Esses processos incluem aumento da permeabilidade endotelial, vasodilatação, deterioração da membrana basal, proliferação e maturação de células endoteliais, migração, formação de tubos, bem como re-plasticidade e diferenciação (Fallah *et al.*, 2019). Assim, a necessidade de interação de múltiplas células, incluindo células endoteliais (EC), células de membrana, células inflamatórias e células sanguíneas, mobiliza diversas citocinas e fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento placentário, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) B e fator de crescimento transformador B(TGF-β), entre outros (Morse *et al.*, 2019).

Devido aos fatos citados, o presente estudo foca na reunião de informações concisas sobre os mecanismos regulatórios genéticos e moleculares das principais vias angiogênicas, com ênfase na influência na expressão gênica e no comportamento das células endoteliais. Além disso, visamos apontar os principais desafios e os últimos avanços no desenvolvimento de terapias direcionadas baseadas em antiangiogênese. Um dos problemas que será abordado por esta revisão bibliográfica é a compreensão limitada dos mecanismos genéticos específicos que regulam a angiogênese em contextos patológicos, como o câncer e doenças cardiovasculares, que impede o desenvolvimento de terapias mais eficazes e específicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho utiliza a metodologia de revisão de literatura, conforme descrito por Andrade (2021), que define como "[...] desenvolvida com base em material já existente, principalmente livros e artigos científicos". A pesquisa focou na seleção criteriosa de artigos científicos pertinentes, realizada através das plataformas PubMed e SciELO. Os descritores-chave empregados nas buscas foram "angiogenesis," "angiogenesis process", “angiogenesis mechanism and regulation" e “angiogenesis pathways”.

Para assegurar a qualidade e relevância dos estudos selecionados, foram estabelecidos critérios rigorosos de exclusão. Foram excluídos: literatura cinza (não indexada e não publicada em periódicos científicos), estudos secundários (como monografias, trabalhos de conclusão de curso, dissertações, jornais, capítulos de livro, comentários e cartas ao editor), artigos

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

indisponíveis na íntegra e trabalhos não relacionados diretamente com o tema deste estudo. Ademais, foram selecionados apenas estudos publicados dentre os anos 2019 e 2024.

Durante o processo de triagem, identificamos 1.257 artigos. No entanto, uma etapa subsequente de refinamento foi realizada. Dentre os artigos encontrados, foram selecionados aqueles que continham os descritores-chave na busca, seja no título ou no resumo. Esta seleção mais restrita resultou em 122 artigos.

Após uma leitura exploratória desses 122 artigos, 74 deles se destacaram e foram escolhidos para a construção deste trabalho. A seleção baseou-se na robustez das citações de trabalhos que abordam aspectos moleculares das vias angiogênicas e que identificam os alvos críticos para o desenvolvimento e aprofundamento do conhecimento sobre tal processo

Assim, a revisão de literatura conduzida neste estudo teve como objetivo garantir a inclusão dos estudos mais relevantes e fundamentais no campo da angiogênese, proporcionando uma base sólida para a análise e discussão subsequente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sinalização química envolvida nesse processo da angiogênese, Figura 01, se encontra componentes do sistema fator de crescimento endotelial com seu receptor (VEGF-VEGFR), os fatores induzíveis por hipóxia (HIF), o TGF-β e o PDGF. O sistema VEGF-VEGFR tem papel fundamental para a angiogênese (Huang *et al.*, 2021). Dessa forma, a interação entre o VEGF e o VEGFR2 é crucial para a formação de novos vasos sanguíneos (Lugano; Ramachandran; Dimberg, 2024). O fator induzível por hipóxia, HIF, ativa uma via de sinalização que aumenta a expressão de VEGF. Em condições de hipóxia, a via de degradação do HIF é suprimida, permitindo que ele se acumule e ative a expressão do VEGF, promovendo a angiogênese (Eelen *et al.*, 2020). O TGF-β é um regulador chave na angiogênese, tanto durante o desenvolvimento quanto em diversas condições patológicas (Tsiftsoglou, 2021). O TGF-β se liga ao receptor tipo II (TβRII), que então recruta receptores tipo I, conhecidos como ALKs, para ativar a sinalização subsequente. Em células endoteliais vasculares, a sinalização do TGF-β pode promover respostas pró-angiogênicas, dependendo do contexto e de outros fatores regulatórios presentes (Fallah *et al.*, 2019).

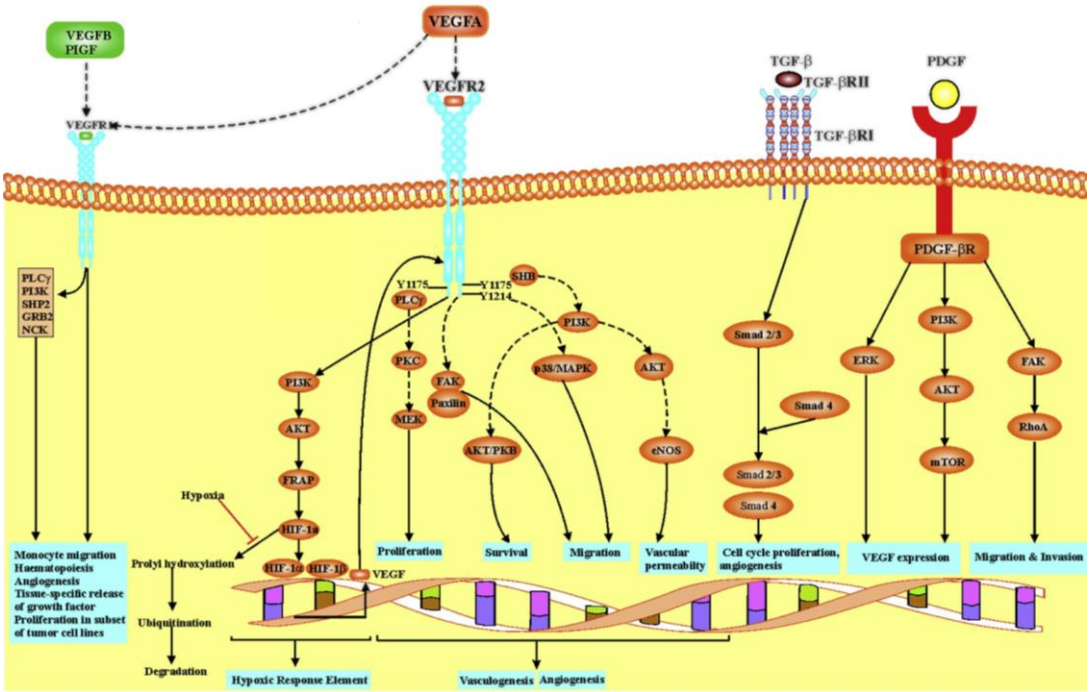
Há também outros componentes importantes, porém, menos citados que se relacionam com as vias angiogênicas incluindo: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e eritropoietina (EPO). Sabe-se que o GM-CSF regula os estágios iniciais e posteriores da formação dos vasos sanguíneos modulando a expressão do VEGF, a razão de

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

expressão de angiopoietina-1(Ang-1)/angiopoietina-2(Ang-2) e a fosforilação de Tie-2 , levando ao desprendimento dos pericitos das células endoteliais, incitando a proliferação e migração dessas células, quando nos estágios finais da cicatrização (Kumar *et al.*, 2022). A EPO pode induzir a proliferação de células endoteliais tanto em tecidos normais quanto em diferentes tecidos cancerosos, modelando a expressão de receptores de seus receptores (EPOR) e de VEGF (Annese *et al.*, 2019).

Os fatores associados à angiogênese estabelecem uma complexa rede de sinalização no nível subcelular, ligando-se a seus receptores específicos. Essa rede é acionada por receptores de tirosina-quinase (RTK) e subsequentemente estimula vias a jusante como Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt/mTOR e PKC (Lugano; Ramachandran; Dimberg, 2024). Os detalhes das vias de sinalização intracelular, o mecanismo de sua ativação e as diferentes moléculas envolvidas na transdução de sinal e função dessas vias foram ilustrados em representações gráficas na Figura 1.

Figura 1 - Ligantes/receptores envolvidos na Angiogênese.



Fonte: Adaptado de Fallah *et al.* (2019, p. 776).

Os fatores de transcrição são proteínas que regulam a transcrição ou a expressão de genes específicos, sendo essenciais para coordenar os eventos moleculares e celulares necessários para o crescimento vascular, sendo crucial no processo de angiogênese. Tais proteínas desempenham múltiplas funções na angiogênese, desde a ativação de genes específicos até a modulação de

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

processos celulares essenciais, respondendo dinamicamente ao ambiente para facilitar ou suprimir o crescimento vascular conforme as necessidades fisiológicas ou patológicas (Huang *et al.*, 2021).

A angiogênese, desde um outro ponto de vista, é uma das respostas adaptativas à hipóxia, e é regulada principalmente pelos HIFs. Esses fatores de transcrição são compostos de uma das três subunidades α dependentes de oxigênio (HIF-1, HIF-2 e HIF-3) onde o HIF-1α é o que mais impacta na angiogênese, tendo sua atividade rigidamente controlada em situações não patológicas. Sob hipóxia, seu acúmulo intracelular desencadeia a transcrição de vários genes, envolvidos na sobrevivência/proliferação celular, autofagia, apoptose, metabolismo celular e angiogênese (Annese *et al.*, 2019). A via do HIF também é modulada por microRNAs específicos (miRNAs), ocasionando na variação de várias respostas celulares, incluindo a alteração do processo angiogênico. A atividade pró-angiogênica do HIF-1α não se restringe às células endoteliais, pois também afeta o comportamento de outros tipos de células, incluindo células tumorais, inflamatórias e imunes (Eelen *et al.*, 2020).

Por outro lado, em células endoteliais, o fator nuclear κB (NF-κB) não canônico, é regulado pela cinase indutora de NF-κB (NIK), e desempenha um papel crucial na angiogênese, especialmente em contextos inflamatórios e tumorais. Essa sinalização do NF-κB aumenta a expressão da quimiocina pró-angiogênica CXCL12, promovendo a formação de tubos vasculares. Essa via é ativada por receptores como o LTβR e CD40, sem a necessidade da IKKβ, que é exigida na via canônica (Aguilar-Cazares *et al.*, 2019).

Portanto, a ativação da via não canônica do NF-κB contribui para a angiogênese ao estimular a proliferação e migração das células endoteliais em tecidos tumorais, e sua sinalização aumenta a formação de tubos vasculares, sendo bloqueada por siRNA direcionado ao NIK, destacando NIK como um potencial alvo terapêutico para tratar doenças inflamatórias crônicas e a angiogênese tumoral desregulada (Rasmi; Sakthivel; Guruvayoorappan, 2020).

No entanto, a angiogênese também pode ser regulada por fatores epigenéticos. Essa regulação no processo da angiogênese envolve mecanismos complexos que incluem metilação do DNA e modificações das histonas, que interferem diretamente na acessibilidade dos promotores de genes angiogênicos e, consequentemente, na ativação ou repressão desses genes (Lu *et al.*, 2021). A metilação do DNA é um processo no qual ocorre a adição de grupos metil às citosinas nas ilhas CpG dos promotores gênicos, sendo catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs). As principais DNMTs são DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, sendo DNMT1 responsável por manter os padrões de metilação após a replicação do DNA, enquanto DNMT3A e DNMT3B estão envolvidas na metilação de novo (Ribatti; Tamma, 2020).

Outro aspecto a ser analisado é como a modificações das histonas influenciam a compactação da cromatina e a acessibilidade do DNA, sendo reguladas direta e indiretamente por diferentes grupos químicos. No ano de 2020, Wei *et al.* ressaltaram : Acetilação catalisada pelas histonas acetiltransferases (HATs), promove a adição de grupos acetil às lisinas das histonas, que, por sua vez, neutraliza cargas positivas relaxando a cromatina e facilitando a transcrição; Desacetilação sendo realizada pelas histona desacetilases (HDACs), remove grupos acetil, resultando na compactação da cromatina e na repressão da transcrição; Metilação catalisada pelas histona metiltransferases (HMTs), pode ocorrer em lisinas e argininas, sendo mono-, di- ou trimetilação. Dependendo da posição, pode ativar ou reprimir a transcrição; Fosforilação catalisada pelas histonas quinases, está geralmente associada à ativação da transcrição e processos de reparo do DNA; Ubiquitinação derivada da adição de ubiquitina às histonas pode marcar proteínas para degradação ou influenciar a transcrição. Essas modificações epigenéticas alteram a estrutura da cromatina, podendo afetar a acessibilidade dos promotores de genes angiogênicos como na compactação e no relaxamento da cromatina. Na primeira, a metilação do DNA e a metilação repressiva das histonas (como H3K9me3) resultam na compactação da cromatina, impedindo a ligação de fatores de transcrição aos promotores, dessa forma recruta proteínas de ligação a metil-CpG (MeCP2) que se associa com as HDACs e outras proteínas repressoras, promovendo a compactação da cromatina (Wei *et al.*, 2020). Já na descompactação da cromatina a acetilação das histonas (como H3K27ac) e a metilação ativadora (como H3K4me3) promovem a abertura da cromatina, facilitando a ligação de fatores de transcrição e a ativação gênica (Lu *et al.*, 2021). Quando ocorre a metilação dos promotores de genes pró-angiogênicos, como VEGF, Ang-1 e fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2), pode ocorrer então o silenciamento desses genes, impedindo a angiogênese (Aspriţoiu *et al.*, 2021).

Muitos estudos ressaltam que a aceitilação e desacetilação das histonas são cruciais para a regulação da angiogênese e como fatores de transcrição como HIF-1α são influenciados por esses processos (Ribatti; Tamma, 2020). Nesse contexto, é notório que as modificações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA e as modificações das histonas, desempenham um papel essencial na regulação da angiogênese. Compreender esses mecanismos oferece novas oportunidades para terapias direcionadas que visam modular a angiogênese em doenças como o câncer, utilizando inibidores de DNMTs e HDACs para regular a expressão de genes críticos.

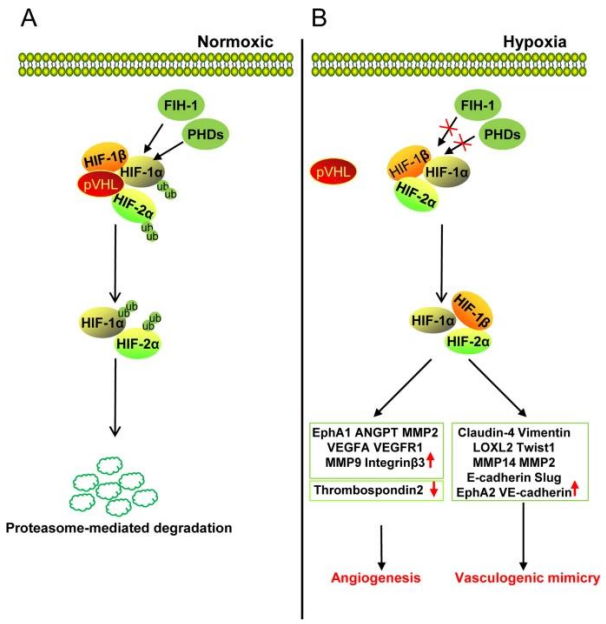
Em situações patológicas como o desenvolvimento de tumores sólidos, as células tumorais consomem uma quantidade significativa de nutrientes e oxigênio, levando à criação de um microambiente deficiente em oxigênio, colocando em risco o crescimento e sobrevivência do

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

tumor (Majidpoor; Mortezaaee, 2021). No entanto, as células tumorais, através de uma reprogramação metabólica, alteram a expressão de proteínas relacionadas à glicólise, como GLUT1, GLUT3, LDHA e PKM2, o que aumenta a captação de glicose e favorece seu crescimento em condições adversas (Jiang *et al.*, 2020).

É digno de notar que o HIF é um regulador crítico da angiogênese no câncer, sendo altamente expresso no microambiente tumoral hipóxico (Annese *et al.*, 2019). Em condições normóxicas, a subunidade HIF-1α é hidroxilada por enzimas como a prolina hidroxilase (PHD) e a aspartato hidroxilase (FIH), o que resulta em sua degradação mediada pela ligase ubiquitina VHL. Tal degradação ocorre devido à ligação da proteína hidroxilada ao VHL, que sinaliza a proteína para degradação proteossomal. Já sob hipóxia, a inativação do PHD impede essa degradação, permitindo a estabilização do HIF-1α, que se dimeriza com HIF-1β e entra no núcleo, onde ativa a transcrição de genes angiogênicos (Fallah *et al.*, 2019). (Figura 2)

Figura 2 – O papel da hipóxia na angiogênese tumoral.



Fonte: Jiang *et al* (2020, p. 776).

Em outra perspectiva, além da ativação de genes pró-angiogênicos, o HIF-1α também atua inibindo a expressão de moléculas anti-angiogênicas, como a trombospondina-2, o que contribui ainda mais para a promoção da angiogênese (Annese *et al.*, 2019). A hipóxia também está associada à regulação da matriz extracelular (ECM), induzindo a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP2 e MMP9), que são essenciais para a invasão e metástase das

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

células tumorais (Al-Ostoot *et al.,* 2021). Essas MMPs facilitam a degradação da matriz, permitindo que as células tumorais migrem para novos locais e também mobilizam proteínas angiogênicas e participam da clivagem de moléculas que regulam a angiogênese. Os fatores FGF e PDGF estão presentes em quantidades semelhantes em células tumorais e normais, com o FGF recrutando células mesenquimatosas ou inflamatórias (Aspriţoiu *et al*., 2021).

4 CONCLUSÃO

A angiogênese, é regulada por uma intrincada rede de mecanismos moleculares, que envolvem fatores de crescimento, vias de sinalização, interações celulares e a influência de microRNAs, todos desempenhando papeis essenciais na modulação da expressão gênica durante a angiogênese. Os fatores de crescimento, especialmente o VEGF. A diminuição do oxigênio celular ativa o HIF, que regula a expressão de genes angiogênicos, como o VEGF.

Algumas doenças como câncer e doenças cardiovasculares são afetadas pelo processo angiogênico. Portanto, é necessário continuar a investigação dos mecanismos moleculares que regem a angiogênese. O avanço nesse campo não só poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como também permitirá uma abordagem mais personalizada no tratamento de doenças associadas à angiogênese desregulada. Intervenções já existentes, como inibidores de VEGF, mostram resultados promissores, mas a busca por novos alvos e a personalização do tratamento são essenciais para maximizar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos colaterais. A contínua investigação sobre a angiogênese é, assim, uma fronteira importante na medicina, com o potencial de oferecer benefícios significativos para pacientes em diversas condições clínicas.

Agradecimentos e Financiamentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que colaboraram na elaboração deste artigo. Em especial, agradeço a João Marcos Oliveira da Silva, cuja contribuição foi essencial para a conclusão deste trabalho, e ao professor Angel Mauricio Castro Gamero pela oportunidade e por toda contribuição. Muito obrigado pelo apoio e dedicação. Financiamento: CAPES AUXPE Processo 88881.708989/2022-01 e Processo 88887.708988/2022-00; FAPEMIG APQ-02291-18.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-CAZARES, D. *et al.* Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer. **Front. Oncol.**, v. 9, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01399. Acesso em: 15 jul. 2024.

AL-OSTOOT, F. H. *et al.* Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 28, p. 100422, 2021. DOI: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468294221001209. Acesso em: 19 maio 2024.

ANNESE, T. *et al.* Erythropoietin in tumor angiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 374, n. 2, p. 266-273, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.12.013. Acesso em: 15 jul. 2024.

ASPRIȚOIU, V. M. *et al.* Epigenetic regulation of angiogenesis in development and tumors progression: potential implications for cancer treatment. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 9, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689962. Acesso em: 15 jul. 2024.

EELEN, G. *et al.* Basic and therapeutic aspects of angiogenesis updated. **Circulation Research,** v. 127, n. 2, 2020. DOI: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316851. Acesso em: 19 maio 2024.

FALLAH, A. *et al.* Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 775-785, 2019. DOI: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218363558. Acesso em: 19 maio 2024.

HUANG, X. L. *et al.* Role of receptor tyrosine kinases mediated signal transduction pathways in tumor growth and angiogenesis—New insight and futuristic vision. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 739-752, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.075. Acesso em: 15 jul. 2024.

KUMAR, A. *et al.* GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 901277, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.901277. Acesso em: 17 jul. 2024.

LUGANO, R.; RAMACHANDRAN, M.; DIMBERG, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 77, p. 1745–1770, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7. Acesso em: 19 maio 2024.

MONACI, S. *et al.* Targeting hypoxia signaling pathways in angiogenesis. **Frontiers in Physiology**, v. 15, 24 abr. 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1408750. Acesso em: 19 maio 2024.

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAAEE, K. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors - clinical perspectives. **Cell Oncol**., v. 44, p. 715–737, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s13402-021-00602-3. Acesso em: 19 maio 2024.

JIANG, X. *et al.* The role of microenvironment in tumor angiogenesis. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 39, p. 204, 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13046-020-01709-5. Acesso em: 15 jul. 2024.

KRETSCHMER, M.; RÜDIGER, D.; ZAHLER, S. Mechanical aspects of angiogenesis. *Cancers*, v. 13, n. 19, p. 4987, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers13194987. Acesso em: 15 jul. 2024.

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAAEE, K. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors - clinical perspectives. **Cell Oncol.**, v. 44, p. 715–737, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s13402-021-00602-3. Acesso em: 15 jul. 2024.

MORSE, M. A. *et al.* The role of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 25, n. 3, p. 912–920, 2019. DOI: https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1254. Acesso em: 15 jul. 2024.

RASMI, R. R.; SAKTHIVEL, K. M.; GURUVAYOORAPPAN, C. NF-*κ*B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v. 130, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110569. Acesso em: 15 jul. 2024.

RIBATTI, D.; TAMMA, R. Epigenetic control of tumor angiogenesis. **Microcirculation**, v. 27, n. 3, p. e12602, 2020. DOI: https://doi.org/10.1111/micc.12602. Acesso em: 15 jul. 2024.

TELEANU, R. I. *et al.* Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. ***J.* Clin. Med.**, v. 9, n. 1, p. 84, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/jcm9010084. Acesso em: 19 maio 2024.

TSIFTSOGLOU, A. S. Erythropoietin (EPO) as a key regulator of erythropoiesis, bone remodeling and endothelial transdifferentiation of multipotent mesenchymal stem cells (MSCs): implications in regenerative medicine. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 2140, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/cells10082140. Acesso em: 15 jul. 2024.

WEI, X. *et al.* Histone methylation and vascular biology. **Clinical Epigenetics**, v. 12, n. 1, p. 30, 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13148-020-00826-4. Acesso em: 15 jul. 2024.

YANG, F.; LEE, G.; FAN, Y. Navigating tumor angiogenesis: therapeutic perspectives and myeloid cell regulation mechanism. **Angiogenesis**, 2024. DOI: https://doi.org/10.1007/s10456-024-09913-z. Acesso em: 15 jul. 2024.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA VIA WNT CLÁSSICA NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL E ANGIOGÊNESE

INFLUENCE OF THE CLASSICAL PATHWAY IN EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND ANGIOGENESIS

Carlos Vinicius Expedito de Souza
Estudante de Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

João Marcos Oliveira da Silva
Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas-MG, Brasil

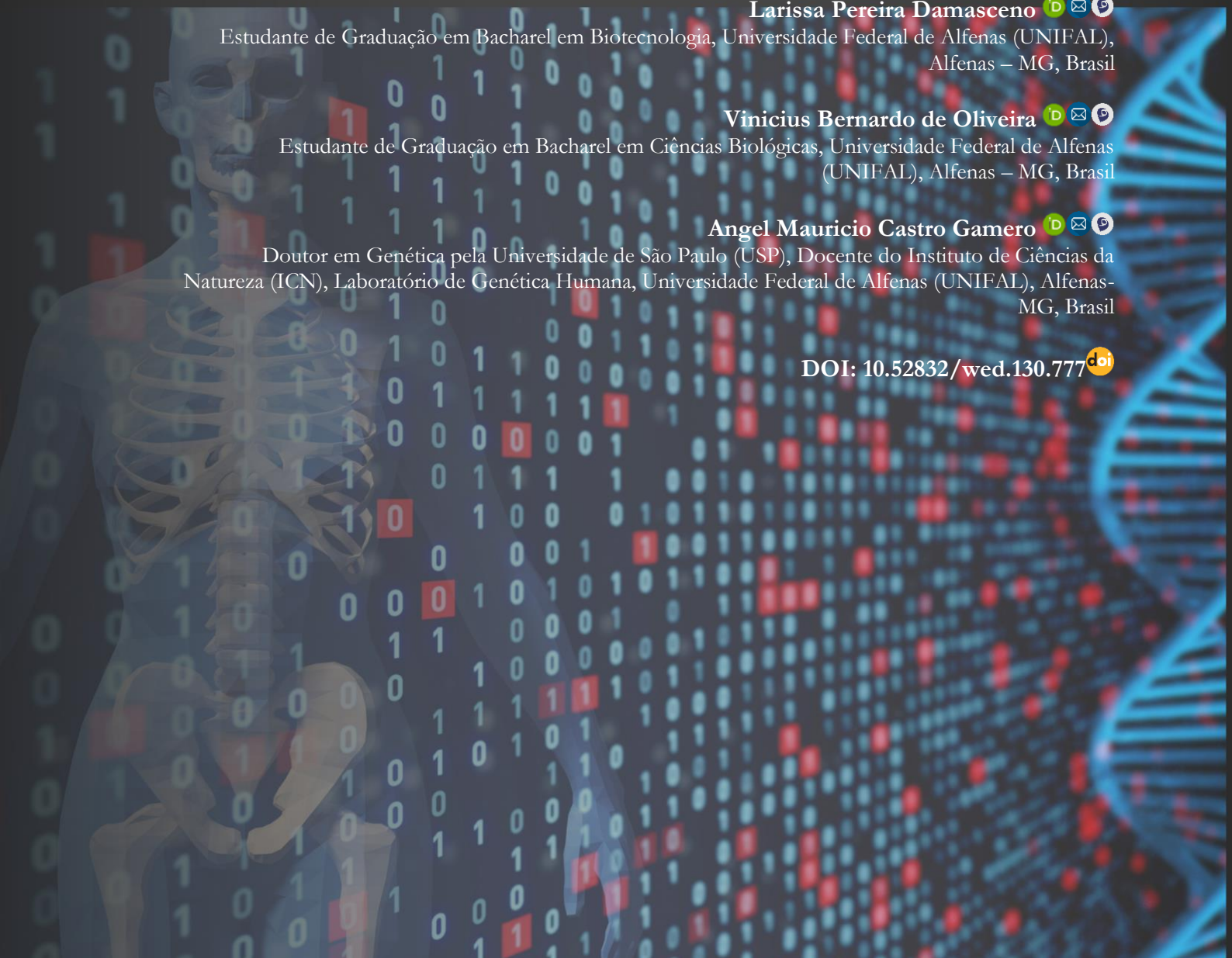
Hanna Karolina de Araujo Batistão
Graduada em Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

Larissa Pereira Damasceno
Estudante de Graduação em Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

Vinicius Bernardo de Oliveira
Estudante de Graduação em Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas – MG, Brasil

Angel Mauricio Castro Gamero
Doutor em Genética pela Universidade de São Paulo (USP), Docente do Instituto de Ciências da Natureza (ICN), Laboratório de Genética Humana, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas-MG, Brasil

DOI: 10.52832/wed.130.777



Resumo: A via clássica de sinalização WNT é crucial para a regulação da β-catenina, uma proteína vital para a proliferação celular. Alterações nesta via têm implicações na carcinogênese, afetando a adesão celular, e colaborando para a sobrevivência tumoral e posterior metastatização. Este estudo revisa e sintetiza descobertas recentes sobre os mecanismos moleculares mediados pela via WNT, com enfoque em sua dinâmica e seu impacto na carcinogênese, com enfoque na transição epitélio-mesenquimal (EMT) e a angiogênese. Em nossa revisão, observamos que a ativação da via WNT inibe a degradação da β-catenina, a qual atua regulando a adesão celular e promovendo a sobrevivência tumoral, mediante a formação de complexos com fatores de transcrição, como TCF/LEF1, ativando genes oncogênicos como c-Myc, CCND1 e Bcl-2. Ela ainda desempenha um papel crucial na EMT, ativando fatores como Snail, Slug e Twist, que promovem maior mobilidade e invasividade celular, e regula a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs), essenciais para a invasão tumoral. Além disso, a β-catenina aumenta a expressão de VEGF, essencial para a angiogênese tumoral, interagindo com a via hipoxêmica e TGF-β. A revisão dos mecanismos influenciados pela via WNT e β-catenina destaca sua importância na carcinogênese, abordando aspectos como proliferação celular, EMT, invasão e angiogênese. Esses conhecimentos são cruciais para entender a complexidade da tumorigênese e poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e melhorias nos diagnósticos de câncer. Futuros estudos devem focar em explorar mais profundamente essas interações para identificar potenciais alvos terapêuticos e aprimorar as abordagens diagnósticas.

Palavras-chave: Angiogênese. Transição epitélio mesenquimal. via WNT.

Abstract: The classical WNT signaling pathway is crucial for the regulation of β-catenin, a protein essential for cellular proliferation. Alterations in this pathway have implications for carcinogenesis, affecting cell adhesion and contributing to tumor survival and subsequent metastasis. This study reviews and synthesizes recent findings on the molecular mechanisms mediated by the WNT pathway, focusing on its dynamics and impact on carcinogenesis, with an emphasis on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and angiogenesis. Our review observes that WNT pathway activation inhibits β-catenin degradation, which regulates cell adhesion and promotes tumor survival through the formation of complexes with transcription factors, such as TCF/LEF1, activating oncogenes such as c-Myc, CCND1, and Bcl-2. It also plays a crucial role in EMT by activating factors such as Snail, Slug, and Twist, which promote increased cell mobility and invasiveness, and regulates matrix metalloproteinase (MMP) activity, essential for tumor invasion. Additionally, β-catenin enhances VEGF expression, crucial for tumor angiogenesis, interacting with the hypoxic and TGF-β pathways. The review of mechanisms influenced by the WNT pathway and β-catenin highlights their importance in carcinogenesis, addressing aspects such as cell proliferation, EMT, invasion, and angiogenesis. These insights are crucial for understanding the complexity of tumorigenesis and may contribute to the development of new therapeutic strategies and improvements in cancer diagnostics. Future studies should focus on further exploring these interactions to identify potential therapeutic targets and refine diagnostic approaches.

Keywords: Angiotensin. Epithelial mesenchymal transition. WNT pathway.

1 INTRODUÇÃO

As células possuem um complexo mecanismo de controle de ciclo celular, o qual pode ser perturbado e gerar um desequilíbrio que resulte em uma multiplicação descontrolada de células.

Esse descontrole proliferativo é uma das principais características de uma neoplasia de comportamento maligno, câncer, o qual em seu desenvolvimento, denominado de progressão tumoral, é capaz de adquirir comportamento invasivo, o qual resulta em invasão de tecido saudável (Alberts, 2017). Esse mecanismo de migração e colonização de tecidos saudáveis é denominado de metastatização, sendo este, consequência da progressão tumoral (Chaffer; Weinberg, 2011).

À medida que a progressão tumoral avança, além da capacidade metastática, a qual é mediada pela EMT, o tumor também é capaz de promover a angiogênese, o qual é consequência da queda do gradiente de oxigênio ofertado no interior do tumor, junto com a queda de nutrientes. Sendo o principal mediador da angiogênese o é o fator induzido por hipóxia 1 (HIF1∝), o qual é um promotor do metabolismo glicolítico, atuando como base para a síntese de biomassa, o que resulta em um aporte do crescimento tumoral, e também, atuando como um regulador da expressão do fator de crescimento vascular endotelial, culminando a angiogênese (Paredes; Williams; San-Martini, 2021).

Tanto a migração como a angiogênese, são comportamentos pertencentes às marcas registradas do câncer, *hallmarks of cancer* (Hanahan, 2022), sendo estas reguladas por um grande conjunto de vias, dentre as quais se encontra a via WNT (Jung; Park, 2020). A via WNT é uma cascata de sinalização intracelular, onde na sua forma clássica, regula a concentração ou eliminação da β-catenina, proteína que quando acumulada no citoplasma é direcionada ao núcleo e promove a transcrição de fatores que induzem a proliferação celular (Zhan; Rindtorff; Boutros, 2016). Por essa razão a via WNT possui a característica de ser um grande regulador da homeostase da replicação celular e da regeneração tecidual (Rim; Clevers; Nusse, 2022).

Por essa razão, objetivamos esclarecer por meio de uma revisão de literatura os mecanismos pelos quais a via WNT e sua regulação da β-catenina estão associadas a características malignas do câncer, como metastatização e angiogênese.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo adota a metodologia de revisão de literatura, conforme descrito por Andrade (2021), que a caracteriza como "desenvolvida com base em material já existente, principalmente livros e artigos científicos". A investigação se concentrou na seleção minuciosa de artigos científicos relevantes, realizada por meio das plataformas PubMed e SciELO. Os termos de busca utilizados foram "WNT signaling", "WNT pathway EMT", e “WNT pathway angiogenesis."

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Para assegurar a qualidade e pertinência dos estudos selecionados, foram estabelecidos critérios rigorosos de exclusão. Foram descartados: literatura cinza (não indexada e não publicada em periódicos científicos), estudos secundários (como monografias, trabalhos de conclusão de curso, dissertações, jornais, capítulos de livro, comentários e cartas ao editor), artigos indisponíveis na íntegra e trabalhos não diretamente relacionados ao tema desta pesquisa, focando no período dos últimos 5 anos.

Durante o processo de triagem, foram identificados 724 artigos. No entanto, uma etapa subsequente de refinamento foi realizada. Entre os artigos encontrados, foram escolhidos aqueles que continham os termos de busca no título ou no resumo. Esta seleção mais criteriosa resultou em 98 artigos. Após uma leitura exploratória desses 98 artigos, 67 se destacaram e foram selecionados para a construção deste estudo. A escolha foi baseada na solidez das citações de trabalhos que exploram aspectos moleculares das vias angiogênicas e que identificam os alvos críticos para o desenvolvimento e aprofundamento do conhecimento sobre esse processo.

Dessa forma, a revisão de literatura conduzida neste estudo teve como objetivo garantir a inclusão dos estudos mais relevantes e essenciais no campo da via WNT e seu impacto na transição epitélio mesenquimal angiogênese, fornecendo uma base sólida para a análise e discussão subsequente. Essa abordagem não só assegura a relevância e atualidade da pesquisa, mas também permite uma compreensão detalhada dos mecanismos e vias que regulam o processo de angiogênese.

A metodologia empregada envolveu uma análise detalhada de cada artigo, considerando aspectos como a metodologia utilizada nos estudos, os resultados obtidos, e a contribuição de cada pesquisa para o campo da sinalização celular. Além disso, a análise crítica dos artigos selecionados permitiu identificar lacunas no conhecimento atual e sugerir novas direções para pesquisas futuras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A via clássica do WNT regula de modo direto a sua ativação a contração de β-catenina a qual além de desenvolver um papel na expressão de transcritos que regulam a proliferação. A ativação da via WNT resulta na inibição por fosforilação do complexo APC/axin/GSK-3β, resultando em um acúmulo de β-catenina no citoplasma celular, uma vez acumulada, β-catenina migra para a membrana nuclear, e ao adentrar ao núcleo, irá interagir com o fator de células T/fator intensificador linfoide-1 (TCF/Lef1), ativando-o tal complexo de transcrição (Pai *et al.*, 2017). No entanto, sabe-se que β-catenina também participa do complexo de junção aderente

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

(ADJ), juntamente com a E-caderina e α-catenina, além de também promover uma co ativação da transcrição do gene alvo WNT (Stamos; Weis, 2008).

A ativação constitutiva da via WNT em células tumorais está fortemente associada à progressão do câncer, sendo um dos principais mecanismos que impulsionam o crescimento descontrolado das neoplasias (Zhang; Ya; Wang, 2020). Estudos recentes têm mostrado que a regulação aberrante da via WNT e o subsequente aumento de β-catenina são características comuns em vários tipos de câncer, incluindo cólon e mama, sublinhando a importância dessa via como alvo terapêutico para estratégias de tratamento mais eficazes e específicas (Kandoth *et al.*, 2013; Liu, Xiaoxu *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022).

A β-catenina desempenha um papel crucial na sobrevivência tumoral por meio de diversos mecanismos complexos que envolvem a regulação gênica e a interação com várias proteínas celulares (Zhu *et.al* 2021), se acumulando no núcleo das células tumorais após a inibição da degradação mediada por GSK-3β e outras quinases. No núcleo, ela se associa com fatores de transcrição como TCF/LEF1, formando complexos que ativam a transcrição de genes oncogênicos, como c-Myc, CCND1 (ciclina D1) (Chen *et al.*, 2022). As proteínas codificadas por esses genes estão envolvidas na promoção da proliferação celular, na regulação do ciclo celular e na inibição da apoptose (Katoh; Katoh, 2022). A ativação do gene c-Myc, reforça a proliferação celular implacável ao permitir que as células cancerígenas entrem novamente no ciclo celular e também acelera a progressão através do ciclo celular ao inibir os pontos de verificação do ciclo celular, contribuindo para o crescimento rápido dos tumores (Dhanasekaran *et al.*, 2021). Além disso, a β-catenina aumenta a expressão de ciclina D1, que está envolvida na progressão do ciclo celular induzindo a transição G1-S por meio da ativação de cinases dependentes de ciclina, Cdk4 e Cdk6 (Valla *et al.*, 2022). EMT

No entanto, a via WNT também desempenha um papel fundamental na modulação da EMT, um processo crucial na progressão tumoral e na metastização. A EMT é caracterizada pela perda de características epiteliais e pela aquisição de propriedades mesenquimatosas, o que permite às células tumorais maior mobilidade e invasividade (Zhang; Xu, 2022).

A β-catenina no núcleo, como já explorado, ativa a expressão de genes que facilitam a EMT, como Snail, ZEB1, Slug e Twist. Esses fatores de transcrição são conhecidos por reprimir a expressão de E-caderina, uma proteína crucial para a adesão epitelial, e induzir a expressão de N-caderina e vimentina, que são marcadores mesenquimatosos. A perda de E-caderina e o ganho de N-caderina e vimentina resultam na desintegração das junções aderentes e na maior

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

mobilidade celular, características típicas da EMT (Adyasha; Sudhansu, 2023; Ma *et al.*, 2017; Wang, Xinggang *et al.*, 2020).

A via WNT influencia a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-2 e MMP-9. Essas enzimas degradam a matriz extracelular, permitindo que as células tumorais invadem tecidos adjacentes e se disseminam para outras partes do corpo. A β-catenina ativa a expressão de genes que codificam essas MMPs, facilitando a remodelação do microambiente tumoral e promovendo a invasão (Unterleuthner *et al.*, 2019).

Sob um outro ponto de vista, a via WNT interage com a via TGF-β para amplificar os efeitos da EMT. TGF-β é um potente indutor de EMT que promove a expressão de Snail e Slug. A β-catenina pode cooperar com TGF-β para intensificar a transcrição desses fatores de transcrição, resultando em uma EMT mais pronunciada e agressiva. Essa interação é crítica para a progressão tumoral, pois a EMT facilitada por TGF-β e WNT contribui para a formação de metástases (Vallée *et al.,* 2017).

Decorrente a ativação da via WNT, a β-catenina influencia a organização do citoesqueleto ao regular a expressão de proteínas que controlam a formação de filamentos de actina e a adesão celular. Esta regulação do citoesqueleto é essencial para a alteração da forma celular e para a migração das células tumorais. A reorganização do citoesqueleto permite que as células tumorais adquirem uma morfologia característica das células mesenquimatosas (Guan *et al.*, 2014; Zhang, Xiao *et al.*, 2020).

A β-catenina também pode afetar o metabolismo celular, promovendo mudanças que favorecem a sobrevivência e a proliferação das células tumorais. Ela ativa a expressão de genes que regulam o metabolismo celular, influenciando a disponibilidade de energia e biomoléculas necessárias para a invasão e metastização. Essas alterações metabólicas proporcionam um ambiente favorável para a progressão do câncer (He *et al.,* 2023).

A β-catenina pode interagir com a via de sinalização hipoxêmica, particularmente com a subunidade alfa do fator induzido por hipóxia (HIF-1α). A presença de β-catenina interagindo com TCF/LEF1 estimula diretamente o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e a amplificação de EGFR estimula a via PI3K/Akt que leva a ativação do mTORC1 promove a ativação do STAT3 e a inibição de 4E-BP1 e então leva à ativação de HIF-1α (Alexandre Vallée; Rémy Guillevin; Jean-Noël Vallée, 2017). A β-catenina também interage com a via TGF-β para regular a expressão de VEGF. TGF-β pode ativar a β-catenina e aumentar a produção de VEGF, ampliando a resposta angiogênica no tumor. Esse crosstalk pode resultar em uma maior angiogênese e progressão tumoral (Wang *et al.*, 2022).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Dentre os genes promotores de angiogênese mais importantes, com interação com beta-catenina, encontra-se o VEGF. Dentre os fatores que provocam uma resposta angiogênica significativa o VEGF tem o maior destaque, pois está implicado no desenvolvimento do tumor, na estrutura vascular e permeabilidade do tumor, na invasividade, na metástase e na recorrência dos cânceres tratados (Seyedehdelaram Ghalehbandi *et al.*, 2023). A β-catenina pode regular a expressão de VEGF, através da deleção endotelial específica de β-catenina, que leva à letalidade precoce resultando na remodelação vascular danificada (Shi *et al.*, 2016), ou indiretamente, ao alterar a expressão de outros fatores de transcrição que modulam VEGF, como é o caso de GSK3ß (Katoh; Katoh, 2006). O aumento na produção de VEGF induzido pela β-catenina contribui para a criação de um microambiente tumoral favorável à angiogênese. VEGF desempenha o papel principal devido ao fato de que a interação do VEGF-A com o receptor 2 do VEGF (VEGFR2), desencadeia uma ampla gama de eventos intra e extracelulares. Esses eventos promovem a sobrevivência, proliferação e migração celular, além da diferenciação das células endoteliais (ECs), vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Seyedehdelaram *et al.*, 2023). A β-catenina, portanto, não só aumenta a produção de VEGF, mas também contribui para a modulação do microambiente ao promover um ambiente hipoxêmico que estimula ainda mais a produção de VEGF (Jung *et al.*, 2021).

4 CONCLUSÃO

A via WNT desempenha um papel crucial tanto na EMT quanto na angiogênese, processos fundamentais para a progressão tumoral e a metástase. A ativação do WNT e a subsequente estabilização e acúmulo de β-catenina no núcleo celular são eventos centrais que regulam uma série de genes associados à proliferação celular, sobrevivência tumoral e invasividade.

No contexto da EMT, a β-catenina nuclear ativa a expressão de fatores de transcrição como Snail, Slug e Twist, que reprimem a E-caderina e aumentam a expressão de N-caderina e vimentina. Essa mudança fenotípica permite que as células epiteliais adquiram características mesenquimais, aumentando sua mobilidade e capacidade de invadir tecidos adjacentes. Além disso, a regulação de metaloproteinases de matriz (MMPs) pela β-catenina facilita a degradação da matriz extracelular, promovendo a disseminação tumoral.

Em relação à angiogênese, a β-catenina induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um regulador chave na formação de novos vasos sanguíneos. A interação de β-catenina com a via hipoxêmica e a via TGF-β amplifica a produção de VEGF,

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

criando um microambiente tumoral propício ao crescimento e à vascularização. Isso não apenas fornece nutrientes e oxigênio às células tumorais, mas também facilita a sua entrada na corrente sanguínea e a formação de metástases em locais distantes.

Portanto, a via WNT, através da β-catenina, exerce uma influência multifacetada que abrange desde a regulação do ciclo celular até a modulação da EMT e a promoção da angiogênese. Esses mecanismos interligados sublinham a importância da via WNT como um alvo terapêutico potencial para intervenções que visam controlar a progressão tumoral e a metastização. A compreensão detalhada dos processos mediados pela via WNT pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e específicas para o tratamento do câncer.

Agradecimentos e Financiamentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização deste capítulo. Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores e mentores, João Marcos Oliveira da Silva, que por sua determinação e por acreditar que podemos mais, nos incentiva com paciência e apoio para que possamos sonhar, e este trabalho é a prova disso, e ao nosso orientador, Prof. Angel Mauricio Castro Gamero, que além de abrir as portas para um sonho, possibilita que possamos mirar cada vez mais alto, pois mesmo que atiremos à lua e erramos, ao menos estaremos entre as estrelas. Por fim, agradeço a todos os autores e pesquisadores cujos trabalhos serviram de base e inspiração para este capítulo. Sem suas contribuições valiosas à literatura científica, este trabalho não teria sido possível. Muito obrigado a todos! Financiamento: CAPES AUXPE Processo 88881.708989/2022-01 e Processo 88887.708988/2022-00; FAPEMIG APQ-02291-18.

REFERÊNCIAS

ADYASHA, B. M.; SUDHANSU, S. N. Therapeutic targeting approach on epithelial-mesenchymal plasticity to combat cancer metastasis. **Medical Oncology**, v. 40, n. 7, 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/s12032-023-02049-y

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 2017.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1203543

CHEN, Y.; *et al.* Knockdown of nuclear receptor binding SET domain-containing protein 1 (NSD1) inhibits proliferation and facilitates apoptosis in paclitaxel-resistant breast cancer cells via

inactivating the Wnt/β-catenin signaling pathway. **Bioengineered**, v. 13, n. 2, p. 3526–3536, 2022. DOI: https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2018973

DHANASEKARAN, *et al.* The MYC oncogene — the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 1, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41571-021-00549-2

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059

JUNG, Y. S.; PARK, J. I. Wnt Signaling in Cancer: Therapeutic Targeting of Wnt Signaling beyond β-Catenin and the Destruction Complex. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 183–191, 2020. DOI: https://doi.org/10.1038/s12276-020-0380-6

KANDOTH, *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333–339, 2013. DOI: https://doi.org/10.1038/nature12634

KATOH, M.; KATOH, M. WNT signaling and cancer stemness. **Essays in Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 319–331, 2022. DOI: https://doi.org/10.1042/ebc20220016

KATOH, M.; KATOH, M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3β to regulate β-catenin and SNAIL signaling cascades. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 9, p. 1059–1064, 2006. DOI: https://doi.org/10.4161/cbt.5.9.3151

LIU, X., *et al.* HIF-1–regulated expression of calreticulin promotes breast tumorigenesis and progression through Wnt/β-catenin pathway activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 44, 2021. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2109144118

LIU, S.; CHEN, S.; ZENG, J. TGF-β signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). **Molecular Medicine Reports**, 2017. DOI: https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7970

MA, F., *et al.* MiR-23a promotes TGF-β1-induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directly targeting CDH1 and activating Wnt/β-catenin signaling. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 69538–69550, 2017. DOI: https://doi.org/10.18632/oncotarget.18422

PAI, S. G., *et al.* Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, 2017. DOI: https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6

PAREDES, F.; WILLIAMS, H. C.; SAN MARTIN, A. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer. **Cancer Letters**, v. 502, p. 133–142, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.020

RIM, E. Y.; CLEVERS, H.; NUSSE, R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. **Annual Review of Biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 571–598, 2022. DOI: 10.1146/annurev-biochem-040320-103615

SEYEDEHDELARAM, G., *et al.* The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. **European Journal of Pharmacology**, v. 949, p.

175586, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175586

SHI, L., *et al.* Evodiamine exerts anti-tumor effects against hepatocellular carcinoma through inhibiting β-catenin-mediated angiogenesis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 12791–12803, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/s13277-016-5251-3

STAMOS, J. L.; WEIS, W. I. The β-Catenin Destruction Complex. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 1, p. a007898, 2013. DOI: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898

UNTERLEUTHNER, D., *et al.* Cancer-associated fibroblast-derived WNT2 increases tumor angiogenesis in colon cancer. **Angiogenesis**, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/s10456-019-09688-8

VALLÉE, A.; LECARPENTIER, Y.; GUILLEVIN, R.; VALLÉE, J. Interactions between TGF-β1, canonical WNT/β-catenin pathway and PARP in radiation-induced fibrosis. **Oncotarget**, v. 90579–90604, 2017. DOI: https://doi.org/10.18632/oncotarget.21234

VALLA, KLÆSTAD, E.; YTTERHUS, B.; BOFIN, A. CCND1 Amplification in Breast Cancer -associations With Proliferation, Histopathological Grade, Molecular Subtype and Prognosis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 27, n. 1, p. 67–77, 1 mar. 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/s10911-022-09516-8

WANG, X., *et al.* HECTD1 regulates the expression of SNAIL: Implications for epithelial-mesenchymal transition. **International Journal of Oncology**, 2020. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5002

YAN, R., *et al.* Liquidambaric acid inhibits Wnt/β-catenin signaling and colon cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3

ZHAN, T.; RINDTORFF, N.; BOUTROS, M. Wnt signaling in cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 11, p. 1461–1473, 2016. DOI: https://doi.org/10.1038/onc.2016.304

ZHANG, Y.; WANG, X. Targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3

ZHU, H., *et al.* Long Noncoding RNA LINC-PINT Suppresses Cell Proliferation, Invasion, and EMT by Blocking Wnt/β-Catenin Signaling in Glioblastoma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 586653, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2020.586653

CAPÍTULO 3

CORANTES FLUORESCENTES NA CITOMETRIA DE FLUXO: MECANISMOS E APLICAÇÕES EM ANÁLISES CELULARES

FLUORESCENT DYES IN FLOW CYTOMETRY: MECHANISMS AND APPLICATIONS IN CELL ANALYSIS

Pedro Henrique Doleski
Doutor em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Docente do Instituto de Biologia (IB), Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas-RS, Brasil

Douglas Gonçalves Friedrichs
Estudante de Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

DOI: 10.52832/wed.130.778

Resumo: A citometria de fluxo é uma técnica poderosa para a análise rápida de células e partículas, permitindo a medição de características físico-químicas enquanto passam por feixes de laser. Os corantes fluorescentes desempenham um papel crucial nesse processo, pois possibilitam a detecção e quantificação de marcadores celulares específicos. Uma justificativa importante para o uso de corantes fluorescentes em vez de anticorpos fluorescentes é o custo reduzido, já que os corantes são moléculas sintéticas de simples produção. Este artigo analisa a importância dos corantes fluorescentes na citometria de fluxo, com foco em produtos das principais empresas do setor: Merck, Thermo Fisher e BD. A metodologia adotada foi uma revisão narrativa da literatura, destacando mecanismos de ação e aplicações em viabilidade, proliferação e apoptose. Os resultados demonstram que os corantes oferecem alta sensibilidade e simplificam a preparação das amostras, permitindo a realização de estudos dinâmicos em células vivas. Assim, a citometria de fluxo, potencializada por esses corantes, se revela uma ferramenta vital para o avanço do conhecimento médico.

Palavras-chave: Análise quantitativa. Diagnóstico clínico. Marcadores celulares. Viabilidade celular. Proliferação celular.

Abstract: Flow cytometry is a powerful technique for the rapid analysis of cells and particles, allowing the measurement of physical and chemical characteristics as they pass through a laser beam. Fluorescent dyes play a crucial role in this process, as they enable the detection and quantification of specific cell markers. An important justification for using fluorescent dyes instead of antibodies is the reduced cost, as these dyes are synthetic molecules that are simpler to produce and use. This article analyses the importance of fluorescent dyes in flow cytometry, focusing on products from leading companies in the field: Merck, Thermo Fisher, and BD. The methodology adopted was a narrative literature review, highlighting mechanisms of action and applications in viability, proliferation, and apoptosis. The results demonstrate that the dyes offer high sensitivity and simplify sample preparation, allowing for dynamic studies in living cells. Thus, flow cytometry, enhanced by these dyes, proves to be a vital tool for advancing medical knowledge.

Keywords: Quantitative analysis. Clinical diagnosis. Cell markers. Cell viability. Cell proliferation.

1 INTRODUÇÃO

O citometro de fluxo é um equipamento poderoso capaz de analisar características morfológicas e químicas de células suspensas em um fluido à medida que elas passam por um estreito capilar em um fluxo constante. Acoplados ao capilar, feixes de laser são então capazes de determinar características particulares das células em análise. No geral, os citômetros apresentam feixes de luz, os quais são capazes de determinar o tamanho e a complexidade das células que passam pelo capilar. Alguns citômetros mais avançados apresentam um ou mais detectores de fluorescência, ou seja, emitem comprimentos de onda os quais excitam moléculas fluorescentes e consequentemente emitem fluorescência a qual é detectada pelo equipamento. Tais moléculas

podem ser absorvidas pelas células ou serem conjugadas a um determinado anticorpo. O citômetro de fluxo, em principal aqueles que detectam fluorescência, foram e são responsáveis por inúmeros avanços das áreas biológicas e médicas, em principal a imunologia. Sendo assim, as análises por citometria de fluxo, uma ferramenta indispensável para diagnósticos clínicos, como também, para o avanço das pesquisas científicas (Saeys; Van Gassen; Lambrecht, 2016).

As populações de células podem ser analisadas e classificadas na citometria de fluxo com base em suas características de dispersão de luz (tamanho e complexidade) ou fluorescência, principalmente utilizando anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Uma vez que um anticorpo conjugado apresenta alta especificidade a uma determinada proteína, é possível determinar o fenótipo das células em análise. Um exemplo é a análise das subpopulações de linfócitos T ($CD3^+$) pelo uso dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, sendo assim possível quantificar os níveis de linfócitos T auxiliares ($CD3^+/CD4^+$) e linfócitos T citotóxicos ($CD3^+/CD8^+$) da amostra. O uso de anticorpos fluorescentes tem ampla aplicação no laboratório clínico e na pesquisa, sendo usada na imunofenotipagem de leucemias e linfomas, na contagem de células $CD4^+$ em pacientes soropositivos, como também para a análise de microrganismos (Oliveira; Pereira; Beitler, 2015).

Enquanto os anticorpos conjugados atuam em proteínas específicas das células, moléculas fluorescentes podem ser empregadas para interagir com estruturas celulares (núcleo, mitocôndria e outras) ou que interagem com moléculas intracelulares. Como por exemplo, corantes que interagem com os ácidos nucleicos, corantes que são metabolizados pelas mitocôndrias, ou que atuam sobre radicais livres de oxigênio (ROS) e cálcio (Ca^{2+}) intracelular (McKinnon, 2018). Os corantes fluorescentes são amplamente utilizados para a análise do ciclo celular, proliferação, apoptose e da viabilidade celular. Além da detecção da ativação da caspase-3, que serve como um importante marcador apoptótico, outras formas para tal análise são os corantes específicos que distinguem células viáveis de não viáveis. Outro método inclui a fragmentação do DNA incorporado a marcadores fluorescentes, que ocorre durante a apoptose, e que pode ser analisada (Adan *et al.*, 2016).

O uso de corantes fluorescentes na citometria de fluxo apresenta diferenças importantes quando comparados aos anticorpos conjugados a fluorocromos. Um ponto interessante de ser citado é o custo mais baixo, uma vez que são moléculas sintéticas não biológicas, as quais não requerem técnicas biotecnológicas avançadas para serem produzidas ou conjugadas. Além disso, os corantes fluorescentes são mais simples de usar, pois não necessitam de múltiplas etapas como os anticorpos, que exigem ligação específica ao antígeno. Eles podem penetrar nas células e

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

marcar componentes celulares diretamente, o que simplifica o processo de preparação das amostras e facilita análises.

Um ponto notável dos corantes fluorescentes é a capacidade de penetrar em células vivas, permitindo marcação em tempo real sem a necessidade de fixação ou permeabilização, o que é fundamental em estudos dinâmicos, como a observação do ciclo celular ou determinação de moléculas intracelulares. Esses corantes são úteis em situações onde se deseja evitar alterar a viabilidade celular, algo que seria mais complicado com anticorpos, que normalmente exigem células fixadas. Corantes fluorescentes também são utilizados para marcar estruturas celulares gerais, como DNA ou proteínas, sendo ideais para estudos onde a especificidade do marcador não é uma prioridade.

O objetivo deste trabalho é analisar e discutir os corantes fluorescentes mais utilizados na avaliação celular por citometria de fluxo, focando em três das maiores empresas do setor: Merck (Sigma-Aldrich), Thermo Fisher e BD. Serão abordados os mecanismos de ação desses corantes, sua importância na diferenciação de características celulares e suas aplicações em estudos de viabilidade, proliferação e apoptose. Além disso, a pesquisa visa destacar como esses corantes contribuem para a precisão e eficiência na análise de populações celulares, fornecendo insights valiosos para pesquisas e diagnósticos clínicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho envolve uma abordagem qualitativa e narrativa, visando analisar os corantes fluorescentes utilizados na citometria de fluxo, especialmente os oferecidos pelas três principais empresas do setor: Merck (Sigma), Thermo Fisher e BD.

2.1 Caracterização da pesquisa

A pesquisa foi baseada em uma revisão narrativa da literatura, abordando artigos, revisões e informações de produtos disponíveis nas plataformas das empresas. A intenção foi oferecer uma visão ampla sobre os corantes, suas características e aplicações.

2.2 Metodologia da pesquisa

Foram descritos os corantes fluorescentes das empresas selecionadas, incluindo seus mecanismos de ação, vantagens e desvantagens, além de suas aplicações em estudos de viabilidade celular, proliferação e apoptose. Os resultados da análise descritiva e dos exemplos

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

discutidos foram integrados, ressaltando a importância dos corantes fluorescentes na citometria de fluxo e suas contribuições para a precisão das análises celulares.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os corantes fluorescentes oferecidos pelas três principais distribuidoras de produtos para citometria de fluxo – Merck (Sigma-Aldrich), Thermo Fisher e BD – em geral possuem moléculas de diferentes mecanismos de ação. Ambas as empresas oferecem reagentes de alta qualidade, com kits especializados e suporte técnico. Essas empresas fornecem os corantes fluorescentes essenciais para a citometria de fluxo, que contribui para o avanço do conhecimento científico. O uso de seus produtos permite que laboratórios ao redor do mundo realizem investigações detalhadas sobre fenômenos celulares complexos, como viabilidade celular, diferenciação, apoptose, e dinâmica de divisão celular, tornando-as essenciais para a compreensão dos mecanismos biológicos em diversos contextos clínicos e de pesquisa. Entre a gama de moléculas florescentes/kits especializados para o uso na citometria de fluxo, discutiremos seus mecanismos e usos na pesquisa laboratorial.

Os corantes BioTracker™ 575 Red Fe^{2+} Dye (Merck) e BioTracker™ Far-red Labile Fe^{2+} Dye (Merck) é uma molécula fluorescente que detecta ferro (II) (Fe^{2+}) em células vivas, mais especificamente no reticulo endoplasmático ou complexo de golgi. O ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) é essencial para a produção de sangue, com cerca de 70% presente na hemoglobina e mioglobina onde exercem papel crucial no processo de respiração. Embora vital para organismos, em células elevados níveis de Fe^{2+} podem causar estresse oxidativo e danos celulares. Em estudo feito por Kim *et al.* (2024), a intensidade fluorescente do ferro foi medida via citometria de fluxo, avaliando o potencial risco de trombose e perturbação da barreira hematoencefálica pela atividade coagulante em hemácias causada por nanopartículas de óxido de zinco. Para isso, o corante (vendido em forma de pó) é diluído em DMSO para 1mM e em seguinte com meio de cultivo pertinente a uma concentração de 5μM. O reagente de uso é adicionado sobre as células a serem analisadas e incubados por uma hora a 37ºC. Após é realizado uma centrifugação, as células precipitam e o excesso de corante é removido ao remover o sobrenadante. É de interesse que se encontre apenas o corante nas células, as quais absorveram o corante, assim as células são lavadas com PBS e centrifugadas novamente. O sobrenadante, com corantes que não reagiram com as células, é descartado e as células podem ser analisadas em citometria de fluxo que apresente laser vermelho (red) com comprimento de onda em 635nm.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Outro corante, é o éster succinimidil de carboxifluoresceína presente no kit BioTracker™ Cell Proliferation (Merck) que se difunde passivamente nas células vivas como ésteres não fluorescentes, sendo posteriormente convertidos em corantes fluorescentes por esterases intracelulares. Esses corantes reagem com grupos amina de proteínas intracelulares, formando conjugados fluorescentes que são retidos dentro da célula. Com isso, é possível acompanhar a divisão celular por meio de picos de fluorescência progressivamente mais fracos, detectados por citometria de fluxo. Já o BioTracker NucView® Caspase-3 (Merck), é um corante bifuncional que detecta a atividade das enzimas caspase-3/7, fundamentais para o processo de apoptose. Após a ativação da caspase, o corante é liberado e migra para o núcleo da célula, onde se liga ao DNA, permitindo tanto a visualização da atividade enzimática quanto das mudanças morfológicas nucleares que ocorrem durante a apoptose. Este corante é amplamente utilizado, como na pesquisa feita por Kerkhofs *et al.* (2021), na qual avaliou os mecanismos pelos quais um peptídeo que interrompe os complexos IP 3 R/Bcl-2, provoca a morte celular em células cancerígenas de células B, e a ativação da caspase 3 foi fundamental para o entendimento.

O kit de coloração de células mortas violeta fixável LIVE/DEAD™ (Thermo Fisher), utiliza corantes que reagem com aminas livres tanto no interior quanto na superfície das células com membranas comprometidas, o que gera uma fluorescência intensa nas células mortas. Nas células viáveis, o corante apenas se liga às aminas da superfície, resultando em uma fluorescência muito mais suave. Essa diferença de intensidade permite distinguir facilmente entre células vivas e mortas, sendo crucial para estudos de viabilidade celular antes de procedimentos como fixação ou permeabilização. O kit de anexina V conjugado com FITC possibilita a detecção fluorescente da anexina V associada a células apoptóticas, além de permitir a quantificação por citometria de fluxo. Esse kit utiliza anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para identificar os locais de fosfatidilserina na superfície da membrana celular, como utilizado no estudo de Chota, Abrahamse e George (2024) que avaliou a viabilidade celular em células de câncer de mama MCF-7

Os produtos, como o BD Pharmingen™ Hoechst 34580 (BD), atuam se ligando especificamente ao DNA fita dupla, permitindo a coloração de núcleos tanto em células vivas quanto fixadas. Essa ligação é altamente específica, o que reduz o risco de coloração de RNA, tornando o Hoechst ideal para análises de ciclo celular. Outra possibilidade é o BD Pharmingen™ Hoechst 33342, um reagente utilizado para coloração fluorescente de DNA e núcleos em células vivas ou fixadas. Este corante bisbenzimidazol apresenta alta especificidade para a ligação ao DNA de fita dupla, preferencialmente se ligando a pares de bases adenina-

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

timina. É comumente empregado em aplicações de citometria de fluxo, como a análise do ciclo celular e a identificação de populações laterais de células-tronco, como isolar neoblastos de planárias feita no estudo de Zhang *et al.* (2024).

O BD Pharmingen™ Blue Live Cell Caspase Probe (BD), por sua vez, detecta células com caspases ativas, as principais enzimas envolvidas no processo apoptótico. Ele contém um inibidor de caspase ligado a um fluorocromo que se une irreversivelmente à caspase ativada, permitindo a detecção de várias formas dessas enzimas e de sua atividade geral. O VPD450 (BD) é um corante de proliferação celular que se difunde passivamente nas células e, uma vez clivado por esterases, torna-se altamente fluorescente. Conforme as células se dividem, a fluorescência é distribuída igualmente entre as células-filhas, permitindo monitorar a divisão celular com precisão. Finalmente, o DRAQ5™ (BD) se liga aos ácidos nucleicos tanto de células vivas quanto fixadas, sendo amplamente utilizado para análises de ciclo celular, visualização nuclear e discriminação entre células nucleadas e detritos.

Os corantes presentes no MitoTracker (Thermo Fisher) são utilizados para análise mitocondrial, os quais atravessam passivamente a membrana plasmática e se acumulam em mitocôndrias ativas. Uma vez que as células em análise apresentem dano mitocondrial e ou perda de potencial, tais mitocondrias não concentrarão grande quantidade do corante. Esta redução na concentração do corante é observada na citometria de fluxo, onde se observa células com menor intensidade de fluorescência e consequentemente comprovando a alteração mitocondrial. O MitoTracker (Thermo Fisher) pode apresentar diferentes fluorocromos os quais podem se adaptar a diferentes comprimentos de onda, como o MitoTracker Deep Red (para 644nm a 665nm), o MitoTracker Green (para 490nm a 516nm) e MitoTracker Orange CMTMRos (554nm a 576nm). Em nosso laboratório de pesquisa observamos que linfócitos residentes do fígado de roedores que recebiam etanol (40%) de forma intermitente apresentavam elevanos niveis de espécies reativas de oxigênio (iROS) através do uso do marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o qual quando oxidado emite fluorescencia o qual é possivel quantificar no citometro de fluxo. A fim de observar se o estresse oxidativo celular provinha da mitocondria utilizamos o corante MitoTracker Red. As análises s das células saudáveis e das células dos animais submetidos ao etanol demonstraram que ambas as amostram apresentaram os mesmos níveis de fluorescencia. Logo, foi possível concluir que a origem do estresse oxidativo das células não provinham da mitocondria e sim por outras vias citosólicas (dados ainda não publicados).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

4 CONCLUSÃO

A citometria de fluxo é uma técnica importante para a análise celular, permitindo a detecção precisa de características como viabilidade, proliferação e apoptose. Nesse sentido, os corantes fluorescentes são de grande interesse para tais análises. Tais testes proporcionam alta sensibilidade e a capacidade de monitorar eventos celulares em tempo real, facilitando investigações complexas na pesquisa científica, como também para diagnósticos clínicos. Mesmo necessitando de um equipamento de alto custo (citometro de fluxo) os corantes apresentam alto rendimento no laboratório (análise de inúmeras amostras) e dão respostas mais concretas sobre os mecanismos celulares envolvidos em determinados tratamentos e estímulos de células mantidas em cultivo celular ou isoladas de amostras biológicas.

REFERÊNCIAS

ADAN, A. *et al.* Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 14 jan. 2016. DOI: https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876

CHOTA, A.; ABRAHAMSE, H.; GEORGE, B. P. Green synthesis and characterization of AgNPs, liposomal loaded AgNPs and ZnPcS4 photosensitizer for enhanced photodynamic therapy effects in MCF-7 breast cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 48, p. 104252–104252, 18 jun. 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104252

KERKHOFS, M. *et al.* BIRD-2, a BH4-domain-targeting peptide of Bcl-2, provokes Bax/Bak-independent cell death in B-cell cancers through mitochondrial Ca2+-dependent mPTP opening. **Cell Calcium**, v. 94, p. 102333–102333, 1 mar. 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102333

KIM, E.-H. *et al.* Promoted coagulant activity and disrupted blood-brain barrier depending on phosphatidylserine externalization of red blood cells exposed to ZnO nanoparticles. **Environmental Pollution**, v. 362, p. 124921, dez. 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124921

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: an Overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 120, n. 1, p. 5.1.1–5.1.11, 21 fev. 2018. DOI: https://doi.org/10.1002/cpim.40

OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA, J.; BEITLER, B. **Mielograma e Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo em Hematologia - Prática e Interpretação**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2015. E-book. ISBN 978-85-277-2837-9

SAEYS, Y.; VAN GASSEN, S.; LAMBRECHT, B. N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 449–462, 20 jun. 2016. DOI: https://doi.org/10.1038/nri.2016.56

ZHANG, W. *et al*. Protocol for culturing and functionally manipulating planarian neoblasts using SiR-DNA-based flow cytometry. **STAR Protocols**, v. 5, n. 1, p. 102877–102877, 6 fev. 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.102877

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

CAPÍTULO 4

ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS RESIDENTES DE ÓRGÃOS IMUNES PRIMÁRIOS, SECUNDÁRIOS E FÍGADO: METODOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES NA PESQUISA

ISOLATION OF RESIDENT LYMPHOCYTES FROM PRIMARY AND SECONDARY IMMUNE ORGANS AND LIVER: METHODOLOGY AND ITS APPLICATIONS IN RESEARCH

Pedro Henrique Doleski
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

Willian Douglas dos Santos Rocha
Estudante de Graduação em Medicina, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

DOI:10.52832/wed.130.779

Resumo: Os linfócitos são células imunes cruciais na manutenção da resposta imunológica e consequente na defesa do organismo. Divididos em dois grandes grupos, os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, enquanto que, os linfócitos T participam da imunidade celular, realizando desde a eliminação de células infectadas até o desenvolvimento de perfis imunes pela secreção de citocinas. Portanto, o estudo dessas células é fundamental para o avanço da compreensão do sistema imunológico, e o isolamento de linfócitos é um passo essencial no campo da pesquisa científica. No entanto, alguns testes laboratoriais necessitam do isolamento de linfócitos viáveis e íntegros para a sua realização. Dessa forma, o presente texto apresenta técnicas para o isolamento de linfócitos residentes dos órgãos imunes primários, secundários e no fígado de ratos *Wistar*. Por fim, o capítulo apresenta resultados relevantes de pesquisas já realizadas seguindo tais técnicas e discute seus benefícios para a imunologia.

Palavras-chave: Linfócitos. Isolamento celular. Linfogênese.

Abstract: Lymphocytes are leukocytes of the immune system, playing a crucial role in defense against foreign agents. Divided into two major groups, while B lymphocytes are antibody producers capable of generating immunological memory, T lymphocytes participate in cellular immunity, performing functions ranging from killing infected cells to assisting and activating other cells. Therefore, the study of these cells is fundamental for advancing the understanding of the immune system, and the isolation of lymphocytes is an essential step in practical research. However, due to cellular complexity, it is necessary to employ the correct technique to ensure an optimal percentage of viable and intact lymphocytes. This text presents lymphocyte isolation techniques in Wistar rats, focusing on primary and secondary immune organs as well as the liver. Finally, the chapter presents relevant results from studies conducted using these techniques and discusses their benefits for immunology.

Keywords: Lymphocytes. Cell isolation. Viability.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é composto de células, tecidos e órgãos que trabalham em conjunto para proteger o corpo contra infecções e doenças. Os seus principais componentes incluem as barreiras físicas, como a pele, células imunológicas (leucócitos), órgãos linfoides, e moléculas fundamentais, tais como anticorpos, proteínas do sistema complemento, enzimas e citocinas (Abbas *et al.*, 2021).

Os linfócitos, células leucocitárias mononucleares, estão envolvidas em diversas funções imunológicas, tais como a citotoxicidade celular, coordenação da resposta imunológica, memória imunológica, controle e supressão celular (Alam; Gorska, 2003). Além disso, as células B e T representam dois grandes grupos linfócitos, e dentro desses grupos há subpopulações com morfologias e funções diferentes, como os linfócitos T $CD8^+$ (citotóxicos), T $CD4^+$ (auxiliares), células NKT e linfócitos B. Tais células, além de serem peças fundamentais na resposta imune adaptativa, também apresentam atividade na resposta inata principalmente devido a produção de

citocinas e desenvolvimento de perfis de resposta imunológica (Duan; Mukherjee, 2016; Escobar; Friedman, 1980).

Em relação à gênese das células linfocitárias, todas são originadas na medula óssea (MO), um tecido imunológico primário que se encontra internamente em alguns ossos do organismo. A função principal da MO é a manutenção e proliferação de células-tronco hematopoiéticas (HSC), além de diferenciação em células progenitoras mieloides e linfoides (Lucas, 2019). Os linfócitos do tipo B são produzidos na MO e já podem migrar para outros órgãos imunes secundários (ex: baço, linfonodos) e não imunes (ex: fígado, pele, outros) (Ichii; Oritani; Kanakura, 2014). Por outro lado, os linfócitos do tipo T após serem produzidos na MO necessitam migrar para o timo (órgão imune primário) onde os linfócitos T adquirem maturação e os autorreativos são eliminadas do organismo (Mesquita Júnior *et al.*, 2010; Thapa; Farber, 2019). Este processo tímico, é de suma importância para o sistema imunológico de um indivíduo, haja vista que, se algo falhar nesse ponto, os linfócitos podem não distinguir quais células são próprias e não próprias, levando a resposta imunológica ineficaz ou doenças de cunho autoimune (Abbas *et al.*, 2021).

Quando as células estão maturadas, os linfócitos são transportados pela corrente sanguínea e direcionados a diversos órgãos imunes e não imunes por meio de mediadores químicos. Uma vez nestes órgãos os linfócitos podem desenvolver suas ações sobre as respostas imunológicas (Chaplin, 2010). Uma diferença marcante em relação aos órgãos imunes secundários é que os linfócitos dos linfonodos respondem aos fatores imunes provindos pelo sistema linfático, enquanto os linfócitos do baço são estimulados por fatores provindos da corrente sanguínea (Abbas *et al.*, 2021). O fígado, por sua vez, apesar de seu papel primário no metabolismo, recebe uma grande carga antigênica via veia porta, devido ao conteúdo gastrointestinal. Assim, ele se destaca na proteção contra patógenos, funcionando como um grande reservatório de células de defesa, incluindo linfócitos, mesmo não sendo considerado um órgão imunológico (Racanelli; Rehermann, 2006).

Devido à magnitude dos linfócitos sobre o sistema imunológico, o estudo dessas células mostra-se fundamental para o desenvolvimento de terapias imunológicas mais eficientes. Além disso, os linfócitos teciduais podem servir de marcadores importantes para avaliar a funcionalidade imunológica nos tecidos e entendermos mais sobre a patogênese das doenças. Deste modo, técnicas de isolamento de linfócitos são um ponto-chave para conduzir pesquisas científicas. Na literatura, diversas técnicas para isolamento de linfócitos teciduais podem ser encontradas, porém tais técnicas não garantem plenamente células viáveis ou íntegras. Sendo

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

assim, o presente capítulo tem como objetivo apresentar técnicas para isolamento de linfócitos residentes de órgãos imunes primários, secundários e fígado com alta pureza e viabilidade celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes químicos

Solução fisiológica (SF; 0,9% de NaCl), reagente de densidade Ficoll-Hypaque (densidade 1,079), Solução tampão hemolítica (HBS: 155,2 mM NH4Cl; 12 mM NaHCO3; 0,01 mM EDTA), Solução tampão fosfato salino (PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na2HPO4; 1,5 mM KH2PO4), PBS-EDTA (PBS adicionado de 5 mM EDTA). Todas as soluções são preparadas com água deionizada e destilada.

2.2 Coleta de amostras

Para a eutanásia do animal, é sugerido sacrificá-lo em uma câmara anestésica com isoflurano. Após a eutanásia, o animal deve ser reperfundido com 15 ml PBS-EDTA por acesso na veia porta, para remover a presença de sangue dos tecidos. O processo de reperfusão é indispensável uma vez que no sangue estão presentes linfócitos em transporte, os quais podem "contaminar" o isolamento dos linfócitos residentes dos tecidos. Logo, após realizado a reperfusão os órgãos podem ser coletados com auxílio de tesoura cirúrgica e armazenados com PBS-EDTA em banho de gelo.

2.3 Coleta de órgãos imunes primários

Posicione o rato em decúbito dorsal (barriga para cima) em uma superfície estéril. A medula pode ser coletada de modo mais fácil no fêmur, então limpe a pele da perna traseira do animal com álcool 70% e, com um bisturi, faça uma incisão na pele ao longo do comprimento do fêmur para expor o osso. Com ajuda de uma tesoura e uma pinça, separe os músculos do fêmur. Após, é preciso realizar cortes nas extremidades da articulação do quadril e do joelho, com auxílio da tesoura e da pinça. O fêmur, então, deve ser colocado em uma placa de Petri contendo solução salina estéril ou meio de cultura, mantendo-o refrigerado até o momento da coleta. Para coletar as células da medula óssea, com auxílio de tesoura, quebrar as extremidades do fêmur. Inserir em uma das extremidades, uma agulha de 21-23 G conectada a uma seringa contendo 5-10 mL de PBS-EDTA frio. Injetar o PBS-EDTA a uma pressão suave e coletar a solução injetada (células). Transfira as células coletadas para um tubo estéril contendo 10 mL de PBS-EDTA gelado, utilizando uma pipeta estéril.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Para a retirada do timo, limpe a pele da região torácica com álcool 70%. Com um bisturi, realize uma incisão mediana ao longo do osso esterno, separando a pele e a musculatura, para expor a cavidade torácica. Delicadamente, a cavidade torácica deve ser aberta para expor o timo, que está localizado sobre o coração, na região superior do mediastino. Com auxílio de uma tesoura cirúrgica e pinça, o timo deve ser removido cuidadosamente para evitar danos no órgão. Por fim, o transfira imediatamente para uma placa de Petri contendo PBS-EDTA gelado para preservar a viabilidade celular.

2.4 Coleta de órgãos imunes secundários

Com o rato em decúbito dorsal, limpe a pele da região abdominal com álcool 70%. Realize uma incisão mediana ao longo da linha média do abdômen com um bisturi. Para localizar o baço, separe a pele e a musculatura da parede abdominal para expor a cavidade abdominal, dessa forma será possível identificar o órgão na parte superior esquerda, próximo ao estômago. Com auxílio de uma tesoura cirúrgica e uma pinça, remova cuidadosamente o baço e o coloque imediatamente em uma placa de Petri com PBS-EDTA para preservar a viabilidade das células.

Para remover os linfonodos mesentéricos é preciso levantar o intestino delgado para expor o mesentério – membrana fina que sustenta os intestinos e contém os linfonodos mesentéricos. Esses linfonodos são pequenos, então, para facilitar a localização, procure perto dos vasos sanguíneos principais.

Para remover os linfonodos da região cervical, com o rato ainda em decúbito dorsal, limpe a região cervical(pescoço) com álcool 70%. Realize uma incisão mediana ao longo da linha média do pescoço utilizando um bisturi. Com auxílio de uma pinça, separe a pele e o tecido subcutâneo para expor a musculatura cervical. Os linfonodos cervicais se encontram adjacentes à traqueia e abaixo das glândulas salivares, superficialmente

Os linfonodos cervicais e mesentéricos devem ser removidos com auxílio de tesouras cirúrgicas e pinças. E ainda, para preservar a viabilidade celular, os linfonodos devem ser colocados em placas Petri, devidamente identificadas, com PBS-EDTA gelado.

2.5 Coleta do fígado

O isolamento de linfócitos residentes no fígado, também conhecidos como linfócitos T intra-hepáticos ou linfócitos hepáticos, apresenta desafios devido à complexidade do ambiente hepático, exigindo métodos específicos para preservar a integridade dessas células.

Com o rato em decúbito dorsal, realize a abertura abdominal assim como descrito anteriormente. Para localizar o fígado, procure na região abdominal superior direita. Em seguida,

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

com o auxílio de uma pinça e um bisturi, deve-se remover o órgão e coletar aproximadamente 3 gramas de tecido hepático e transferi-lo para um recipiente estéril.

2.6 Preparo de amostra

O timo, baço, linfonodos cervicais e mesentéricos e fígado excisado devem ser gentilmente homogeneizados usando um êmbolo de seringa com 10 mL de PBS-EDTA gelado para criar uma suspensão uniforme do tecido. Tais suspensões, como também a suspensão de células da medula óssea, em seguida, deve ser filtrada através de gaze estéril para um tubo cônico para remover detritos teciduais e agregados celulares.

2.7 Isolamento de linfócitos

Após homogeneização e filtração, centrifugue a suspensão a 1.500 RPM (aproximadamente 350g) por 10 minutos para formar um pellet. Após a centrifugação, ressuspender o pellet em 6 mL de PBS-EDTA e adicionar sobre 4 mL de Ficoll-Hypaque (reagente de densidade) em um tubo cônico de 15ml. Centrifugar a mistura a 2.500 RPM (aproximadamente 1.200g) por 20 minutos. Após a centrifugação, uma banda mononuclear rica em linfócitos formará uma interface entre o Ficoll-Hypaque e a solução. Cuidadosamente, essa banda mononuclear rica em linfócitos deve ser coletada.

Transfira a banda coletada para um novo tubo e ressuspenda em 10 mL de solução fisiológica (SF). Centrifugar a 1.000 RPM (aproximadamente 250g) por 15 minutos para sedimentar as células. Para remover contaminantes adicionais, lave o pellet resultante. Adicione 5 mL de HBS ao pellet e centrifugue a 1.000 RPM (aproximadamente 250g) por 10 minutos. Em seguida, ressuspender o pellet mais três vezes adicional com 5 mL de SF, centrifugando a 1.000 RPM (aproximadamente 250g) por 10 minutos a cada vez, para remover plaquetas, amônia (do tampão hemolítico) e outros contaminantes. Finalmente, ressuspenda o pellet resultante com SF frio para preservar a integridade celular e mantenha a suspensão em temperatura ambiente até o momento de uso.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento de linfócitos em diferentes tecidos é desafiador, visto que exige um conhecimento anatômico do animal, delicadeza na coleta, destreza no processamento e conhecimento preciso da técnica de extração linfocitária. No entanto, ao utilizar protocolos detalhados que guiam o pesquisador no processo de pesquisa, os desafios são mitigados e os experimentos facilitados. Métodos para o isolamento de linfócitos teciduais são encontrados na

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

literatura; no entanto, uma série de incompatibilidades são encontradas para a determinação das certas análises laboratoriais (Curry *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000). Essas incompatibilidades incluem o uso de reagentes que interferem na atividade de enzimas, na permeabilidade celular nos testes de coloração, entre outros a depender a análise pretendida (Doleski *et al.*, 2017). Além disso, a maior parte dos protocolos de isolamento tecidual utiliza colagenase, uma enzima responsável pela degradação do colágeno do tecido coletado. Porém o uso da colagenase é capaz de induzir ativação celular, redução na viabilidade celular e degradação de glicoproteínas presentes na membrana das células isoladas (Curry *et al.*, 2000). Considerando que na maior parte das análises linfocitárias necessitamos avaliar os marcadores de superfícies presentes na membrana plasmática (glicoproteínas também conhecidas como CD; *clouster of diferenciation*) é de extrema importância a utilização de técnicas que assegurem a integridade da membrana plasmática.

Sendo assim, o grande objetivo das técnicas citadas no capítulo é o de garantir o isolamento de células viáveis e com membrana plasmática integra para análises linfocitárias. Trazemos como exemplo a caracterização de ectoenzimas, ou seja, enzimas presentes ancoradas à membrana celular das células. Nesse sentido, para verificar a viabilidade e integridade celular, foi utilizado o método de exclusão via corante Azul de Tripan, além da técnica de lactato desidrogenase (LDH), usando um kit comercial. Como resultado, o teste Azul de Tripan demonstrou mais de 98% de viabilidade celular logo após o isolamento e as células não apresentaram alterações com até 6 horas de isolamento. O teste de LDH revelou que a viabilidade e integridade celular permaneceu inalterada após 2 horas de incubação. Estes resultados se devem provavelmente a dois motivos principais. Primeiro pelo uso de PBS-EDTA nas etapas iniciais de homogenização dos tecidos, essa solução tampão também atua como quelante de cátions divalentes (como o cálcio (Ca_2^+) e o magnésio (Mg_2^+)) os quais são liberados das células no momento da homogeneização tecidual. Esses cátions podem induzir processos de ativação celular, logo o uso do PBS-EDTA é capaz quelar tais compostos evitando a ativação celular e possíveis processos danosos ou mudança de fenótipo das células isoladas. Em segundo está a realização da dissociação celular (homogeneização) de forma mecânica sem a necessidade do uso de enzimas de digestão (como a colagenase). Em comparação com técnicas com enzimas, a técnica aqui descrita é mais demorada e necessita de grande cautela para realizar dissociação mecânica de forma eficiente, mas sem causar danos as células do tecido. Porém, com sua devida padronização em laboratório (dos equipamentos e da equipe), a técnica se demonstra consistente

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

para o isolamento de linfócitos teciduais aptos para serem utilizados em diversos testes laboratoriais.

O resultado da técnica de isolamento são células mononucleares, porém com uma alta concentração em linfócitos. Sendo que para o isolamento dos órgãos citados o resultado de todos são o isolamento de 95% (ou mais) de linfócitos. A contaminação de 5% de outras células em geral é por outras células mononucleares como monócitos e macrófagos. Uma maneira simples de remover tais monócitos/macrófagos (aproximadamente 5%) é levar as células isoladas para uma placa de cultivo celular. Monócitos/macrófagos são células aderentes, e em aproximadamente 30 minutos a 37ºC se aderem a placa de cultivo. Os linfócitos que não são células aderentes podem ser coletados do sobrenadante e utilizadas com 100% de pureza, quando necessário tal nível de pureza. Interessantemente, as técnicas descritas podem isolar apenas células com morfologia de linfócitos maduros residentes nos órgãos imunes. Não sendo esta técnica apta para testes que prezam pela avaliação de linfócitos progenitores.

Para determinar a atividade destas ectoenzimas, é essencial que as células em análise apresentem alta viabilidade celular e, principalmente, integridade celular para evitar a contaminação com enzimas intracelulares. Sendo assim, para realizar a caracterização da atividade da E-NTPDase (CD39), ectoenzima ancoradas à membrana celular capazes de hidrolisar nucleotídeos (ATP e ADP), em linfócitos hepáticos, Doleski et al., (2017) padronizou e utilizou-se do método específico descrito no item 2. Já para realização da caracterização, como também estudar as propriedades cinéticas da E-NTPDase de linfócitos em órgãos primários e secundários, realizou-se o isolamento de linfócitos residentes na medula óssea, timo, baço, linfonodos mesentéricos e cervicais utilizando os protocolos 2.1-4. (Doleski *et al.*, 2021; Doleski *et al.*, 2023). Além da alta pureza e viabilidade das células isoladas, a técnica também é positiva para a remoção de possíveis interferentes químicos devido às centrifugações seriadas. Por exemplo, para a avaliação da E-NTPDase é realizado teste espectrocolorimétrico que quantifica a produção de fosfato via degradação de ATP e ADP, porém o fosfato é um composto presente no PBS e em meio de cultivo celular. As centrifugações seriadas com solução fisiológica foram capazes de eliminar plenamente a presença de fosfato, sem interferir na determinação da atividade enzimática.

Além das caracterizações da E-NTPDase outras análises já foram desenvolvidas pelas técnicas de isolamento linfocitário descrito neste capítulo. Por exemplo, De Grando *et al.* (2018) isolou linfócitos esplênicos para avaliar o efeito de imunoglobulinas específicas no tratamento de roedores infectados com *Trypanosoma cruzi*. A técnica de isolamento de linfócitos hepáticos foi

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

utilizada para a avaliação do efeito imunomodulador do disseleneto de difenila em animais infectados com *Toxoplasma gondii* (Doleski *et al.*, 2017). Da silva *et al.* (2023) utilizou-se das técnicas descritas para a avaliação da ação imunomoduladora e antitumoral da istradefilina em linfócitos do baço e timo de animais com indução experimental de melanoma. Além disso, mais recentemente em nosso laboratório de pesquisa, realizamos tais técnicas de isolamento para avaliar o fenótipo e os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares em linfócitos teciduais por citometria de fluxo (dados ainda não publicados).

Por fim, salientamos que mesmo sendo dispendiosa no quesito de procedimentos e tempo, ou seja, inúmeros passos não automatizados e centrifugações, a técnica descrita resulta em linfócitos teciduais saudáveis para a realização de diversos testes laboratoriais. O uso do reagente de densidade (Ficoll-Hypaque®) não apresenta alto custo econômico, sendo de fácil obtenção e compra para laboratórios de pesquisa. Além disso, esta técnica não necessita de equipamentos específicos como um citômetro de fluxo com *cell sorting*, o qual é raro encontrar em laboratórios de pesquisa devido seu alto custo de manutenção. Entretanto, é necessária uma profunda análise do protocolo, uma vez que, o próprio reagente de densidade (Ficoll-Hypaque®) e a solução hemolítica quando muito tempo em contato com as células em isolamento podem induzir citotoxicidade e perda na viabilidade e integridade celular.

4 CONCLUSÃO

A padronização das técnicas de isolamento de linfócitos, conforme detalhado nos protocolos desenvolvidos por Doleski, possibilitou a caracterização precisa da atividade enzimática da E-NTPDase nos principais órgãos do sistema imunológico, como fígado, medula óssea, timo, baço e linfonodos. A metodologia comprovou-se fundamental para manter a viabilidade e a integridade dos linfócitos isolados, essenciais para a obtenção de dados confiáveis em análises laboratoriais. Além disso, estes métodos permitiram a identificação de diferenças fenotípicas importantes entre os linfócitos residentes em diferentes órgãos, reforçando a necessidade de investigações específicas para cada subpopulação de linfócitos, com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre as distintas funções imunológicas desempenhadas em cada local anatômico.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. *et al.* Cellular and molecular immunology / Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai; illustrations by David L. Baker. 2021.

ALAM, R.; GORSKA, M. 3. Lymphocytes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 SUPPL. 2, 2003.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, 2010.

CURRY, M. P. *et al.* Isolation of lymphocytes from normal adult human liver suitable for phenotypic and functional characterization. **Journal of immunological methods**. v. 242, p. 21-31, 2000.

DA SILVA, J. L. G. *et al.* Istradefylline induces A2A/P2X7 crosstalk expression inducing pro-inflammatory signal, and reduces AKT/mTOR signaling in melanoma-bearing mice. **Medical Oncology,** v. 40, p. 178, 2023.

DE GRANDO, T. H. *et al.* Ecto-enzymes activities in splenic lymphocytes of mice experimentally infected by Trypanosoma cruzi and treated with specific avian immunoglobulins: an attempt to improve the immune response. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 448, p. 9–15, 2018.

DOLESKI, P. H. *et al.* Characterization of E-NTPDase (EC 3.6.1.5) activity in hepatic lymphocytes: A different activity profile from peripheral lymphocytes. **Cell biochemistry and function**, v. 35, n. 2, p. 105–112, 2017.

DOLESKI, P. H. *et al.* Diphenyl diselenide modulates nucleotidases, reducing inflammatory responses in the liver of Toxoplasma gondii-infected mice. **Purinergic Signalling**, v. 13, p. 489–496, 2017.

DOLESKI, P. H. *et al.* Distinct kinetics for nucleotide hydrolysis in lymphocytes isolated from blood, spleen and cervical lymph nodes: Characterization of ectonucleotidase activity. **Cell Biochemistry and Function**, v. 39, n. 4, p. 511–520, 1 jun. 2021.

DOLESKI, P. H. *et al.* Kinetic properties of E-NTPDase activity in lymphocytes isolated from bone marrow, thymus and mesenteric lymph nodes of Wistar rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 479, p. 2447–2458, 2023.

DUAN, L.; MUKHERJEE, E. Focus: Microbiome: Janeway's Immunobiology, Ninth Edition. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 89, n. 3, p. 424, 2016.

ESCOBAR, M. R.; FRIEDMAN, HERMAN. Macrophages and lymphocytes, nature, functions, and interaction. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 121B, 1980.

ICHII, M.; ORITANI, K.; KANAKURA, Y. Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, p. 421, 2014.

LUCAS, D. Leukocyte Trafficking and Regulation of Murine Hematopoietic Stem Cells and Their Niches. **Frontiers in immunology**, v. 10, 2019.

MATSUMOTO, T. *et al.* Orally administered decoction of Kampo (Japanese herbal) medicina,"juzen-taiho-to" modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 149-161, 2000.

MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário-Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552–80, 2010.

THAPA, P.; FARBER, D. L. The role of the thymus in the immune response. **Thoracic surgery clinics**, v. 29, n. 2, p. 123, 2019.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

CAPÍTULO 5

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE PEIXES DOS AFLUENTES DA BACIA DO RIO MUNIM – MA

MOLECULAR IDENTIFICATION OF FISH FROM THE TRIBUTARIES OF THE MUNIM RIVER BASIN – MA

Luana da Silva Pereira
Graduada em Ciências Naturais Licenciatura, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) Caxias-MA, Brasil

Elidy Rayane de Rezende França
Mestre em em Ciência Animal pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luis-MA, Brasil

Eline Silva Lima
Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

Marcelo Silva de Almeida
Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís-MA, Brasil

Jordânia Letícia do Nascimento Silva
Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

Maria Claudene Barros
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Pará (UFPA), Docente do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, Departamento de Química e Biologia, *Campus* Caxias, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

Elmary da Costa Fraga
Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Pará (UFPA), Docente do Curso de Ciências Naturais Licenciatura, Departamento de Química e Biologia, *Campus* Caxias, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

DOI:10.52832/wed.130.780

Resumo: A ictiofauna Neotropical, a mais diversa do mundo, inclui mais de 6.200 espécies, muitas destas, estão presentes no Maranhão, estado com grande potencial hídrico. A bacia do Rio Munim, uma das 12 bacias do estado, é essencial para a agricultura e pesca. Sendo assim, este estudo visou identificar molecularmente a ictiofauna dos afluentes da bacia do Rio Munim, utilizando DNA *Barcoding* para apoiar programas de conservação. Espécimes foram coletados em afluentes como os rios Preto, Mocambo e Baía de São José, abrangendo três municípios maranhenses. O DNA foi extraído, amplificado e sequenciado, gerando 63 sequências do gene COI (665 pb), representando 18 espécies de 3 ordens, 12 famílias e 19 gêneros. As análises filogenéticas, baseadas no modelo Kimura2, mostraram forte sustentação dos clados (95-100% de *bootstrap*), com concordância geral com a morfologia das espécies, exceto para *Hoplias malabaricus*, *Leporinus piau* e *Leporinus* sp.*,* que apresentaram incertezas taxonômicas. As distâncias genéticas intraespecíficas variaram de 0 a 1%, enquanto a divergência interespecífica foi de 0,2 a 32,3%. Métodos de delimitação de OTUs (ABGD, ASAP, bPTP e GMYC) apontaram variações, sobretudo para espécies do gênero *Leporinus*. O uso do DNA *Barcoding* foi eficaz, permitindo a identificação e confirmação de 95% das espécies analisadas, destacando-se como uma ferramenta importante para estudos de biodiversidade e manejo na região.

Palavras-chave: COI. Diversidade. Neotropicais.

Abstract: The Neotropical ichthyofauna, the most diverse in the world, includes more than 6,200 species, many of which are present in Maranhão, a state with great water potential. The Munim River basin, one of the 12 basins in the state, is essential for agriculture and fishing. Therefore, this study aimed to molecularly identify the ichthyofauna of the tributaries of the Munim River basin, using DNA *Barcoding* to support conservation programs. Specimens were collected in tributaries such as the Preto, Mocambo and Baía de São José rivers, covering three municipalities in Maranhão. The DNA was extracted, amplified and sequenced, generating 63 sequences of the COI gene (665 bp), representing 18 species from 3 orders, 12 families and 19 genera. Phylogenetic analyses based on the Kimura2 model showed strong support for the clades (95-100% bootstrap), with general agreement with the morphology of the species, except for *Hoplias malabaricus*, *Leporinus piau* and *Leporinus* sp., which presented taxonomic uncertainties. Intraspecific genetic distances ranged from 0 to 1%, while interspecific divergence ranged from 0.2 to 32.3%. OTU delimitation methods (ABGD, ASAP, bPTP and GMYC) indicated variations, especially for species of the genus *Leporinus*. The use of DNA *Barcoding* was effective, allowing the identification and confirmation of 95% of the analyzed species, standing out as an important tool for biodiversity and management studies in the region.

Keywords: COI. Diversity. Neotropical.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se a existência de 1,8 milhão de organismos vivos, dos quais cerca 55 mil são espécies de vertebrados. Dentre esses, 36.936 são espécies de peixes, que são representados por 85 ordens, 536 famílias e cerca de 5.280 gêneros, habitando tanto ambientes dulcícolas quanto marinhos. Na água doce, a diversidade de peixes alcança 18.781 espécies (Fricke; Eschmeyer; Van Der Laan, 2024). A ictiofauna da Região Neotropical é considerada a mais diversa do mundo com mais de 6.000 espécies catalogadas (Reis; Kullander; Ferraris, 2016; Albert; Tagliacollo; Dagosta, 2020). A América do Sul, parte dessa região, abriga a maior

diversidade de peixes de água doce, incluindo aproximadamente de 6.200 espécies descritas, o que representa cerca de um terço de todas as espécies conhecidas (Reis *et al.*, 2016, Castro; Polaz, 2020).

O Maranhão é um estado brasileiro que apresenta grande potencial hídrico representado por 12 bacias hidrográficas com rios perenes e uma boa disponibilidade pluviométrica. Entre essas bacias, destaca-se a bacia do rio Munim, que cobre uma área de 15.817,4 km² no Nordeste do estado. A bacia é genuinamente maranhense, com sua nascente situada em Aldeias Altas e desagua na Baía de São José, entre as cidades de Axixá e Icatu, após percorrer 275 km². Na bacia do rio Munim, a agricultura e a pesca são atividades econômicas fundamentais para a subsistência das comunidades locais, exercendo grande importância para os 27 municípios da região (Nugeo, 2016).

Estudos sobre a ictiofauna das bacias hidrográficas do Maranhão baseiam-se principalmente em trabalhos taxonômicos, dentre eles, destacam-se os realizados nas bacias ou tributários dos rios Itapecuru, Mearim, Pindaré, Munim, Preguiças e Periá (Soares, 2005; Barros; Fraga; Birindelli, 2011; Brito *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2020; Fraga; Barros, 2023; Vieira *et al.*, 2023; Limeira Filho *et al.*, 2024), e outros por meio compilação de literatura abrangendo os rios Turiaçu, Pericumã, Maracaçumé, Gurupi (Castro; Dourado, 2011; Abreu *et al.*, 2019; Koerber *et al.*, 2022).

Segundo Vieira *et al.* (2023), a diversidade ictiológica das bacias hidrográficas do Maranhão reflete a rica biodiversidade da região Neotropical, com destaque para a bacia do rio Munim, que desempenha um papel fundamental na economia local e serve como habitat para uma ampla variedade de espécies de peixes. Os mesmos autores ainda relatam que entre os afluentes do rio Munim, o rio Mocambo, rio Preto e a Baía de São José se destacam pelo interesse em pesquisas, dada a escassez de estudos e a falta de dados detalhados, e que esta ausência de informações representa uma oportunidade para aprofundar o conhecimento sobre a biodiversidade desses rios, contribuindo para o avanço científico e o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação.

Recentemente Vieira *et al.* (2023) descreveram 123 espécies de peixes na bacia do Rio Munim, no estado do Maranhão. Segundo os autores, esses achados são fundamentais para compreender os processos históricos que influenciaram a evolução dos peixes de água doce no Brasil e destacam, a crescente necessidade de pesquisas voltadas para a identificação taxonômica com uso de marcadores moleculares. Os mesmos autores apontam, ainda, que fragmentos de genes mitocondriais têm sido amplamente utilizados como ferramentas complementares à

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

taxonomia clássica, especialmente na resolução de problemas relacionados à identificação de espécies. Dentre esses genes, o Citocromo Oxidase subunidade I (COI) obteve maior destaque na identificação molecular de espécies de animais nas últimas décadas, em que um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb) de nucleotídeos é utilizado como o código de barras universal de DNA, também conhecido como DNA *barcoding* (Hebert *et al*., 2003). É importante frisar que o DNA *barcoding* permite a identificação a partir de fragmentos de tecidos, ovos, alevinos e adultos de peixes, o que possibilita a detecção de fraude ou substituição de espécies em transações comerciais (Smith; Mcveagh; Steinke, 2008).

Assim, a proposta de identificação padronizada, utilizando o gene COI na identificação de espécies constitui uma ferramenta bastante empregada atualmente como apoio a taxonomia (Hebert *et al*., 2003). Portanto, a bacia do rio Munim com sua grande importância socioeconômica necessita de estudos visando a identificação molecular da sua biodiversidade ictiofaunística (Vieira *et al.,* 2023). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi identificar a fauna de peixes nos principais afluentes dessa bacia, visando contribuir com o conhecimento da biodiversidade de peixes deste importante ecossistema maranhense.

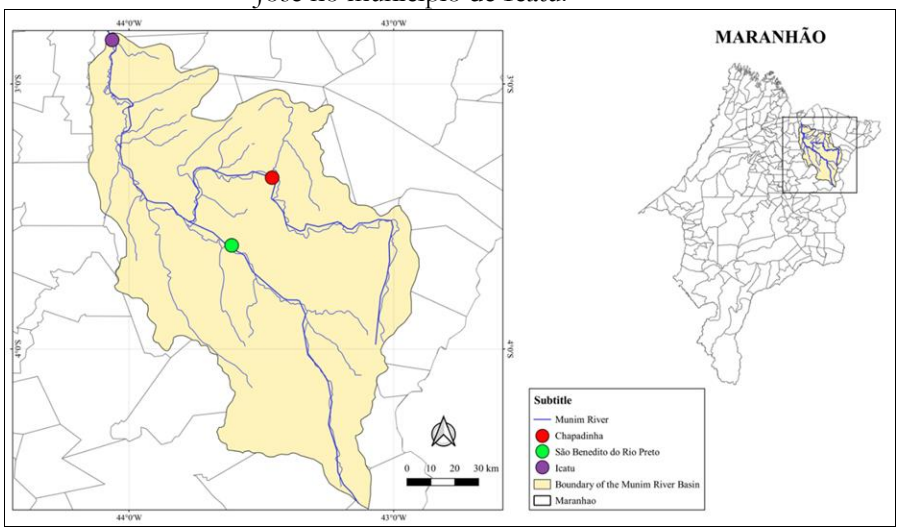
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudos e obtenção das amostras

A coleta dos espécimes foi realizada nos afluentes: Rio Preto, Mocambo e Baia de São José, nos municípios de São Benedito do Rio Preto, Chapadinha e Icatu, respectivamente (Figura 1; Tabela 1).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Figura 1 – Localização da área de estudo dos afluentes da bacia do rio Munim: rio Preto no munícipio de São Benedito do Rio Preto; Mocambo no município de Chapadinha e Baía de São José no município de Icatu.



Fonte: Autores, 2024.

Tabela 1 – Áreas de estudo, locais das coletas e coordenadas geográficas onde as amostras foram obtidas dos afluentes da bacia do Rio Munim.

Áreas de estudo	Locais de coleta	Curso	Coordenadas Geográficas	
			Latitude	Longitude
Rio Munim	Rio Preto	Médio	3°19'35.6"S	43°29'54.6"W
	Mocambo	Alto	3°40'23.1"S	43°32'24.4"W
	Icatu	Baixo	2°48'24.8"S	44°03'07.2"W

Fonte: Elaborada pelos autores, 2024.

Foram realizadas seis excursões de coleta com duração média de dois a três dias cada, todas as coletas foram devidamente realizadas com a autorização ICMBio nº 81592-1 e submetido a Comitê de Ética da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, no Protocolo Nº 02/2022. Para as coletas, foram usadas redes de malhadeiras com malhas de 15mm, 25mm, 35mm e 45mm entre nós adjacentes (Mérona *et al.*, 2010b) assim como tarrafas (malhas de 12-35 mm) e redes de mão (malha de 5 mm) para peixes de pequeno porte (Oyakawa *et al.*, 2006). Os espécimes coletados foram eutanasiados pela técnica de imersão em água gelada (Ashley, 2007), acondicionados em sacos plásticos e transportados em gelo até o Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL), situado no Complexo GENBIMOL da Universidade Estadual do

Maranhão – UEMA, *Campus* Caxias, onde foram etiquetadas, fotografadas e retiradas as amostras de tecido muscular. Os tecidos foram preservados em álcool 90% e mantidos sob refrigeração a –20Cº. Os exemplares foram fixados em formalina 10%, conservados em álcool 70% (Malabarba; Reis, 1987). A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de literaturas específicas (Britski; Silimon; Lopes, 2007; Soares, 2005) (Figura 2).

Figura 2 –Triagem dos espécimes.

Fonte: Autores, 2024.

2.2 Caracterização molecular

O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification Promega seguindo as instruções do fabricante. O isolamento e a amplificação do gene mitocondrial COI, foram realizados através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando a combinação de primers FishF1 e FishR1 descritos por Ward *et al.* (2005). A PCR foi feita em um volume de 25 µl, contendo: 4 µl de DNTPs; 2,5 µl de solução tampão (10X); 0,5 µl de MgCl2; 2 µl de DNA, 0,25 µl de cada primer, 0,2 µl da enzima Taq polimerase e 15,3 µl de H2O. Seguindo os parâmetros: uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento 54° por 30 segundos, extensão 72°C por 1 minuto e uma extensão final 72° por 10 minutos.

Após o processo de amplificação, os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e as amostras positivas foram submetidas a uma reação de sequenciamento seguindo o método proposto por Sanger, Nickeln e Coulson (1977), conhecido como método didesoxiterminal, utilizando o Kit Big Dye TM Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Readyc Reaction em um sequenciador automático ABI Prism™ 3500.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

2.3 Análises dos dados

As sequências foram alinhadas no Clustal W e editadas no Bioedit (Hall, 1999). Para gerar matrizes de divergência genética e árvores filogenéticas, foi utilizado o MEGA X (Kumar *et al.,* 2018) com os métodos de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou; Nei, 1987) e Máxima Verossimilhança, aplicando o modelo de Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) e análise de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). A similaridade foi verificada nas plataformas *BOLDSystems* (The Barcode of Life Data System) (Ratnasingham; Hebert, 2007). A árvore de Inferência Bayesiana foi gerada com o software BEAST (Drummond; Rambaut, 2007; Suchard *et al.,* 2018), usando o modelo HKY+G+I e um relógio lognormal relaxado (Drummond; Rambaut 2007). A convergência foi checada com o Tracer (Rambaut *et al.,* 2014b), e a árvore foi visualizada e editada no Fig Tree (Rambaut *et al.* 2014a) e Inkscape.

Além disso, foi realizada a delimitação de Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) usando os modelos *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (Puillandre *et al.,* 2012), *Assemple Species by Automatic Partitioning* (ASAP) (Puillandre *et al.,* 2020), *Poisson Tree Process* (bPTP) (Zhang *et al.,* 2013) e *Generalized Model Yule Coalescent* (GMYC) (Fujisawa; Barraclough, 2013), com base em diferentes tipos de dados e algoritmos. O ABGD e ASAP foram executados em servidores online, o bPTP utilizou uma árvore de Máxima Verossimilhança gerada no RaxML (Stamatakis, 2014), e o GMYC usou uma árvore consenso ultramétrica gerada no BEAST e analisada em pacotes disponíveis no software R Studio v4.1.0 (Venables; Ripley, 2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do fragmento e comparação nucleotídica

Este estudo analisou 63 sequências do gene COI, com 665 pares de bases, obtidas de espécimes coletados nos afluentes da bacia do Rio Munim. As amostras foram provenientes de três locais: o rio Preto, no município de São Benedito do Rio Preto (10 espécies), rio Mocambo em Chapadinha (cinco espécies), e a Baía de São José, em Icatu (três espécies). As espécies pertencem à classe Actinopterygii, distribuídas em três ordens, 12 famílias, 17 gêneros e 18 espécies.A ordem Characiformes foi a mais representativa, com 12 espécies, seguida por Siluriformes com cinco, e Acanthuriformes com uma espécie., concordando com um padrão esperado para as regiões neotropicais (Polaz *et al.,* 2014; Reis; Kullander; Ferraris, 2016; Brito *et al.*, 2019, Dagosta; Pinna, 2019; Guimarães *et al.*, 2020; Castro; Polaz, 2020; Vieira *et al.*, 2023).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Na análise filogenética, verificou-se um fragmento de 375 sítios conservados, 290 sítios variáveis e 279 informativos para parcimônia. A análise de composição nucleotídica revelou 29,3 % de timina, 27,9% de citosina, 24,4% de adenina e 18,2% de guanina. Esses valores estão de acordo com os valores encontrados para genes mitocondriais em estudos com DNA *barcoding* (Ward *et al*., 2005; Henriques, 2010).

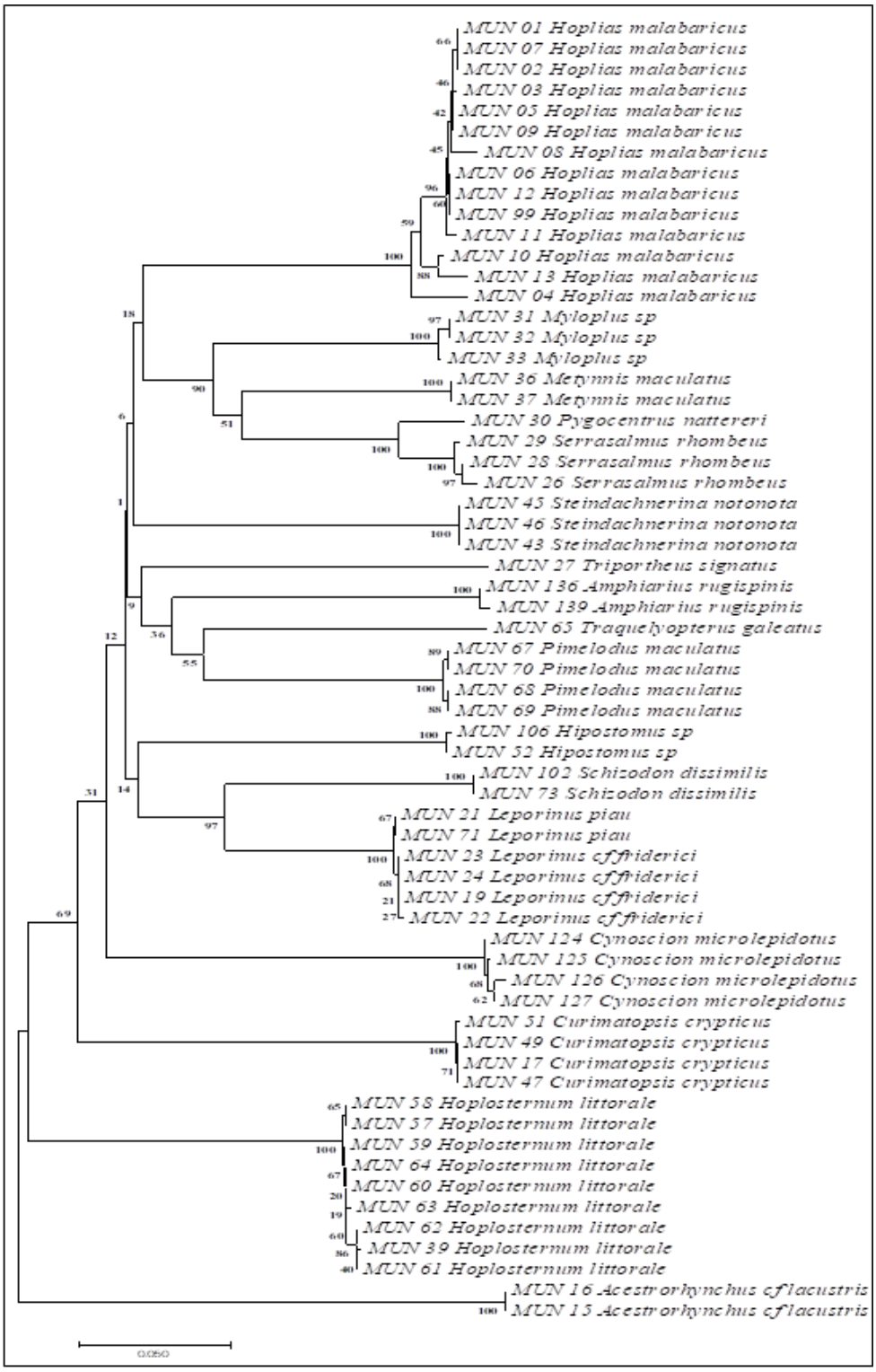
3.2 Relações filogenéticas e delimitação de OTUs

A árvore filogenética gerada pelo método Neighbor-Joining e o algoritmo Kimura-2-Parâmetros (K2P) formou clados bem suportados, com elevados valores de *bootstrap* (100%), agrupando sequências coespecíficas. A análise filogenética revelou a formação de três subclados para *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), evidenciando uma clara diferenciação genética intraespecífica.

A espécie *H. malabaricus*, apresentou o primeiro clado, com 96% de *bootstrap*, agrupando 11 espécimes; o segundo clado, com 88% de *bootstrap*, incluiu 2 espécimes, e o terceiro, com 59% de *bootstrap*, teve apenas 1 espécime. Embora todos os indivíduos tenham sido identificados morfologicamente como *H. malabaricus*, as análises filogenéticas indicaram uma diferenciação genética interna significativa. Estudos anteriores, como o de Pires, Barros e Fraga (2021), identificaram altos níveis de variabilidade genética e diversidade haplotípica nesta espécie, corroborando nossos resultados que também apresentaram elevadas taxas de diferenciações genéticas, em consonância com estes achados outras pesquisas sugerem a presença de um grupo de espécies crípticas dentro deste táxon (Pereira *et al*., 2017; Marques *et al*., 2013; Rosso *et al*., 2018), havendo, portanto, a necessidade de uma revisão taxonômica para uma compreensão mais aprofundada da diversidade genética dentro de *H. Malabaricus* (Pires; Barros; Fraga) (Figura 3).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Figura 3 – Árvore filogenética (NJ) baseada em sequências do gene COI de peixes dos afluentes da bacia do Rio Munim. Os números dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 réplicas), dos rios Rio preto, Mocambo e Baia de São José.



Fonte: Autores, 2024.

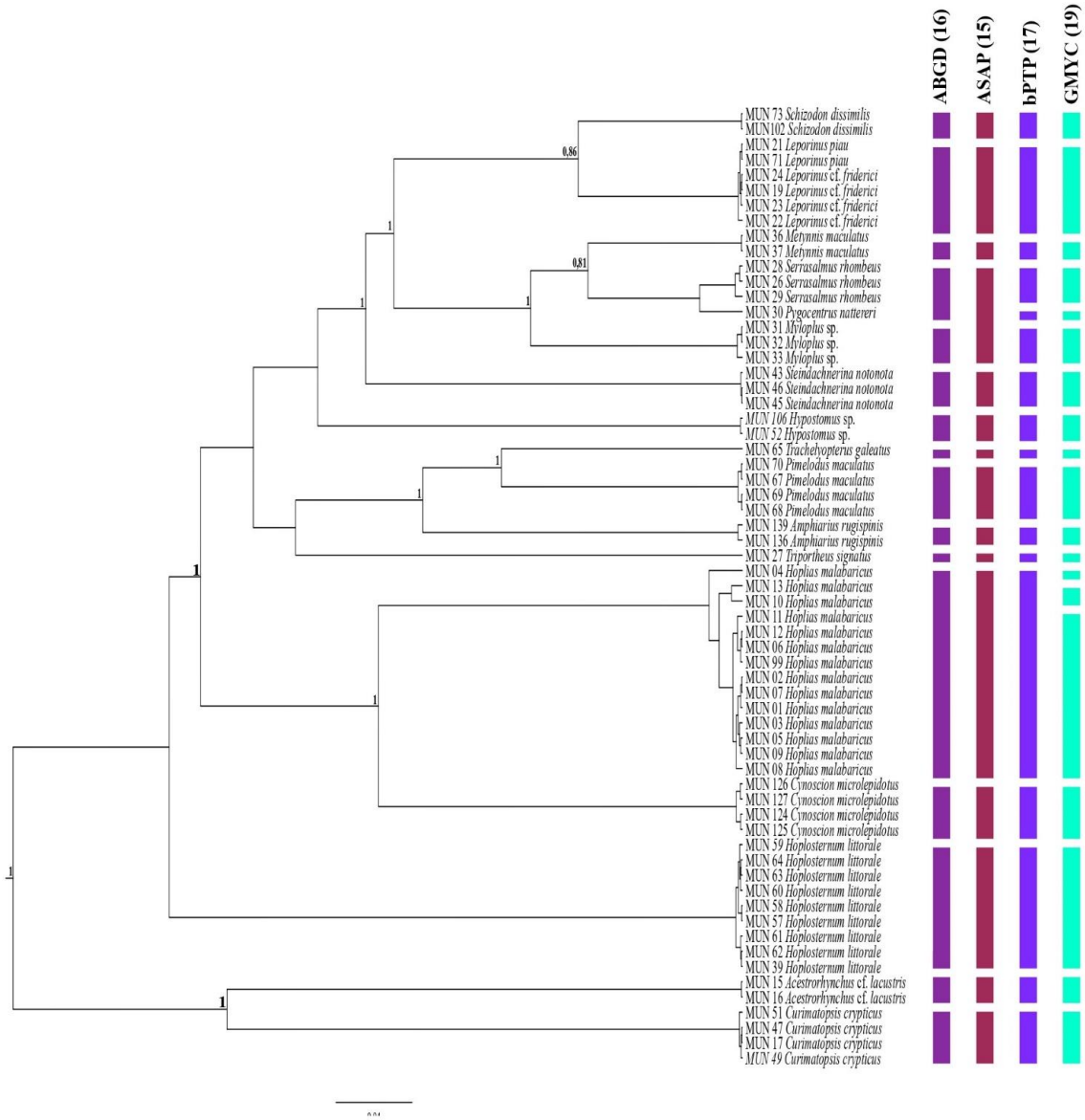
Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Ao analisar os modelos de delimitação, observou-se que o método ABGD identificou 16 OTUs, agrupando *Pygocentrus nattereri* com *Serrasalmus rhombeus*, em uma única OTU, corroborando os achados Cardoso-Silva *et al.* (2021), que indicaram que essas espécies pertencem a uma família monofilética. O método ASAP definiu 15 OTUs, agrupando *Serrasalmus rhombeus*, *Pygocentrus nattereri* e *Myloplus* sp., em uma única OTU, não conseguindo distinguir essas espécies, que são facilmente reconhecíveis morfologicamente, como relatado por Hubert *et al.* (2008), que sustentaram o monofiletismo com base em sinapomorfias morfológicas. O método bPTP identificou 17 OTUs, enquanto o GMYC identificou 19 OTUs, separando *Hoplias malabaricus* em três unidades taxonômicas, resultado semelhante aos de Cardoso-Silva *et al.* (2022, dados não publicados) e Guimarães *et al.* (2022), que também observaram essa separação na espécie.

Além disso, as espécies *L. piau* e *Leporinus* sp., pertencentes ao mesmo gênero, foram agrupadas em uma única OTU (Figura 4). Esses resultados corroboram os de Nascimento *et al.,* (2023), que também encontraram dificuldades na separação dessas espécies, sugerindo que elas podem representar linhagens crípticas ou variantes mal resolvidas, indicando a necessidade de uma revisão genética mais detalhada neste grupo.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Figura 4 – Árvore de inferência bayesiana evidenciando os agrupamentos das OTUs obtidas pelas diferentes abordagens de delimitação de espécies. O modelo ABGD delimitou 16 OTUs, o modelo ASAP 15 OTUs, o modelo GMYC delimitou 19 OTUs e o modelo bPTP 17 OTUs.



Fonte: Autores, 2024.

3.3 Distância genética

Os resultados do presente estudo revelaram que a matriz de divergência genética intraespecífica variou de 0 a 1% com valores máximos observados para a espécie *H. malabaricus*. Já a média de divergência interespecífica variou de 0,2 a 32,3 %, o maior valor ocorreu entre as espécies *Metynnis maculatus* e *Acestrorhynchus* cf. *lacustris* sendo esperado já que são de famílias diferentes, enquanto o menor valor foi entre as espécies *Leporinus piau* e *Leporinus* sp. pertencentes a mesma família Anostomidae (Tabela 2), estes valores divergem os achados de pesquisas

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

anteriores que apontaram uma distância genética média de 2,2% entre as espécies de *Leporinus*, conforme o estudo de Nascimento *et al.* (2023). Dessa forma, enfatiza-se a necessidade de mais investigações para compreender plenamente a extensão dessa variabilidade e suas implicações para a evolução e conservação dessas espécies. A identificação de espécies por análises moleculares depende da capacidade de distinguir a variação intraespecífica da interespecífica (Nascimento *et al.*, 2016), sendo assim, para o sucesso do DNA *barcoding*, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie devem ser mais similares entre si do que entre diferentes espécies (Pereira *et al.*, 2017). Vale ressaltar que as médias intraespecíficas foram calculadas apenas para as espécies com mais de um exemplar representado.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-34-7|DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Tabela 2 – Médias de divergências intraespecífica (diagonal) e interespecífica para as espécies de peixes dos afluentes do Rio Munim através do gene COI.

	Divergência %														
Espécies	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
1.*Acestrorhynchus* cf. *Lacustris*	**0**														
2.*Curimatopsis crypticus*	29,7	**0**													
3.*Steindachnerina notonota*	30,2	23,3	**0**												
4.*Hoplias malabaricus*	31,5	25,2	21,5	**1**											
5.*Leporinus* cf. *friderici*	29,8	21,1	20,1	20	**0**										
6.*Leporinus piau*	29,5	21	20,2	19,7	0,2	**0**									
7.*Schizodon dissimilis*	30,8	24,1	22	22,8	13,9	13,9	**0**								
8.*Metynnis maculatus*	32,3	24,9	20,5	20,3	19,3	19,1	20,3	**0**							
9.*Serrasalmus rhombeus*	29,6	24,6	20,3	21,4	18,7	18,9	20	14	**0**						
10.*Myloplus* sp.	28,3	24,6	22,9	20,3	18,7	18,9	19,5	17,3	15,4	**0**					
11.*Amphiarius rugispinis*	28,1	25,4	22	22,7	23,6	23,8	23,9	22,2	22,2	21,3	**0**				
12.*Hoplosternum littorale*	26,8	26	28,4	24,2	24,9	25,1	27,6	26,1	26,7	26,6	24,9	**0**			
13.*Hipostomus* sp.	28,8	25,3	21,4	21,7	17,7	17,8	22,5	22,5	22,7	22,2	23,9	23,8	**0**		
14.*Pimelodus maculatus*	28,7	26,1	24,8	21,2	20,6	20,4	23,2	23,4	21,7	21,3	20,9	23,9	19,9	**0**	
15.*Cynoscionmicrolepidotus*	32,3	25,7	24,4	24,3	21,6	21,8	25,6	23,6	25,1	24,3	25,8	26,8	24,7	22,9	**0**

Fonte: Elaborada pelos autores, 2024.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

3.4 Identificação molecular *BoldSystems*

As sequências obtidas foram comparadas às referências disponíves na plataforma *BOLDSystems* para a identificação molecular das espécies. O processo foi baseado na similaridade entre as sequências de DNA, com um limite de divergência de 2% para distinguir os diferentes táxons (Ward; Hanner; Hebert, 2009).

Dessa forma, a similaridade entre as sequências variou de 99,33% a 100% corroborando a identificação morfológica para as espécies: *Acestrorhynchus* cf. *lacustris* (Lütken, 1875), *Curimatopsis crypticus* (Vari, 1982), *Steindachnerina notonota (*Miranda Ribeiro, 1937), *Triportheus signatus* (Garman, 1890), *Leporinus piau* (Fowler, 1941), *Schizodon dissimilis* (Garman, 1890), *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1858), *Metynnis maculatus* (Kner, 1858), *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766), *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1766), *Amphiarius rugispinis* (Valenciennes, 1840), *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828), *Hypostomus* sp., e *Cynoscion microlepidotus* (Cuvier, 1830). Especificamente, no caso de *H. malabaricus*, a similaridade variou de 99,45% a 100%, enquanto para o gênero *Leporinus*, os valorea ficaram entre 99,68 a 99,84% (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação molecular das espécies de peixes da bacia hidrográficas dos afluentes da bacia do Rio Munim realizada através de comparações das sequencias na plataforma *BOLDSystems.*

Identificação Morfologica	**Identificação Molecular**	**Similaridade%**
Acestrorhynchus cf. *lacustris*	*Acestrorhynchus* cf. *lacustris*	100
Curimatopsis crypticus	*Curimatopsis crypticus*	99.33
Steindachnerina notonota	*Steindachnerina notonota*	99.83
Triportheus signatus	*Triportheus signatus*	100
Pygocentrus nattereri	*Pygocentrus nattereri*	100
Hoplias malabaricus	*Hoplias malabaricus*	99,45/ 100
Leporinus sp.	*Leporinus* cf. *friderici*/ *Leporinus piau*	99,68 / 99.84
Leporinus piau	*Leporinus piau*	100
Schizodon dissimilis	*Schizodon dissimilis*	99,68
Metynnis maculatus	*Metynnis maculatus*	100
Serrasalmus rhombeus	*Serrasalmus rhombeus*	100
Myloplus sp.	*Myloplus* sp.	100

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Trachelyopterus galeatus	*Trachelyopterus galeatus*	99,84
Amphiarius rugispinis	*Amphiarius rugispinis*	100
Hoplosternum littorale	*Hoplosternum littorale*	100
Hypostomus sp.	*Hypostomus* sp.	99.83
Pimelodus maculatus	*Pimelodus maculatus*	99.69
Cynoscion microlepidotus	*Cynoscion microlepidotus*	100

Fonte: Elaborada pelos autores, 2024.

Das 18 espécies registradas neste trabalho, três espécies são consideradas migratórias para a bacia do Rio Munim, sendo elas: *Triportheus signatus*, *Serrasalmus rhombeus* e *Pygocentrus nattereri,* (Vieira *et al.*, 2023). Esse comportamento migratório é relevante para a dinâmica ecológica da bacia, influenciando processos como a reprodução, alimentação e dispersão genética, além de destacar a importância de conservar os corredores aquáticos para manter a conectividade entre habitats (Barbosa, 2024).

Para as espécies *Myloplus* sp., *Hypostomus* sp., não foi possível a identificação em nível de espécie, pois não mostraram correspondências significativas com espécies presentes nas plataformas, diante disto há a necessidade de uma análise morfológica de um especialista para a correta identificação destes táxons.

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos através das análises do gene mitocondrial COI, conclui-se que o código de barras de DNA se mostrou uma ferramenta eficaz na distinção de espécies, revelando uma diversidade significativa e contribuindo com dados importantes para o conhecimento da biodiversidade local. Foi detectada uma baixa variação genética interespecífica de 0,2% entre *L. piau* e *Leporinus* sp., sugerindo incertezas na classificação taxonômica, pois as sequências de *Leporinus* sp. apresentaram similaridade acima de 99,5% com *Leporinus cf. friderici* e *Leporinus piau*, o que indica a necessidade de uma reavaliação taxonômica mais aprofundada. Para a espécie *Hoplias malabaricus*, foi observada a formação de subclados bem definidos, com o modelo de delimitação de espécies GMYC dividindo este táxon em três MOTUs, evidenciando uma diversidade genética que pode corresponder a linhagens diferenciadas. A comparação com os registros existentes na plataforma *BOLDSystems* resultou na confirmação de 95% das espécies analisadas.

Agradecimentos e Financiamento

Os autores agradecem ao Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) e Laboratório de Genética (LABGEN), ambos situados no Complexo Genbimol da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), *Campus* Caxias, por todo aparato fornecido para o desenvolvimento dessa pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa e ao ICMBIO pelas autorizações das coletas.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. M. S. *et al.* Historical biogeography of fishes from coastal basins of Maranhão State, northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology,** v. 17, n. 2, p. e 180156 [1] – e 180156 [10], 2019. DOI: 10.1590/1982-0224-20180156

ALBERT, J; TAGLIACOLLO, V.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical freshwater fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics,** v. 51, n. 1, p. 27- 53, 2020. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032

ASHLEY, P. J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science,** v. 104, n. 3, p. 199-235, 2007. DOI: https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001.

BARBOSA, E. S. S. Anthropogenic barriers and habitat connectivity. **Caderno Pedagógico,** v. 21, n. 3, p. 01-23, 2024. DOI: 10.54033/cadpedv21n3-226.

BARROS, M. C.; FRAGA, E. C.; BIRINDELLI, J. L. O. Fishes from Itapecuru River basin, State of Maranhão, northeast Brazil. Ecology. **Brazilian Journal Biology**, v, 71, n. 2, p. 375-380, 2011. DOI: 10.1590/S1519-69842011000300006

BRITO, P. S. *et al.* Freshwater fishes of the Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses and adjacent areas. Inventory. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 3, p. 2-12. 2019. DOI: 10.1590/1676-0611-BN-2018-0660

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. 2 ed. Brasília, Ed. Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

CARDOSO - SILVA, A. C. *et al.* Dna Barcode confirma a ocorrência de espécies endêmicas do nordeste brasileiro nos tributários da bacia do Rio Mearim, Maranhão/ Brasil. *In*: NASCIMENTO, R. M do (Org.). **A Genética e a Construção de Novos Paradigmas nas Ciências da Vida 2.** Ponta Grossa – PR: Atena, 2021. DOI:10.22533/at.ed.1592126055

CASTRO, A. C. L.; DOURADO, E. C. S. Ictiofauna da Amazônia Oriental Brasileira – um panorama das regiões maranhenses. *In:* Martins, M. B.; OLIVEIRA, T. G. (Org.). **Amazônia Maranhense: diversidade e conservação**, Belém – PA: MPEG, 2011.

CASTRO, R. M. C.; POLAZ, C. N. M. Peixes de Pequeno Porte: A maior e mais ameaçada porção da megadiversa ictiofauna neotropical de água doce. **Biota Neotropica**, v. 20, n. 1, p. 2-12, 2020. DOI: 10.1590/1676-0611-BN-2018-0683

CLOFFBR-MA.pdf. Acesso em: 08 de março de 2024.

DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 1, n. 431, p. 1-163, 2019. DOI: 10.1206/0003-0090.431.1.1.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees. **BMC Evolutinary Biology,** v. 7, n. 214, p. 1-8, 2007. DOI: 10.1186/1471-2148-7-214

FRAGA, E. C.; BARROS, M. C. **Peixes do rio Itapecuru: revelando sua biodiversidade**. 1 ed. Caxias-MA: Ed. UEMA, 2023.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the *bootstrap*. **Evolution,** v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985. Disponível em: https://encurtador.com.br/vSbY6. Acesso em: 20 de fevereiro de 2024.

FRICKE, R; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **Catálogo fishes: genera species, references.** Disponível em: http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp**.** Acesso em: 28 de jul. 2024.

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulater datasets. **Systematic Biology,** v. 62, n. 5, p. 1-49, 2013. DOI: 10.1093/sysbio/syt033

GUIMARÃES, E. C. *et al.* An inventory of Ichthyofauna of the Pindaré River drainage, Mearim River basin, Northeastern Brazil. **Biota Neotropica,** v. 20, n. 4, p. 1-13, 2020. DOI: 10.1590/1676-0611-BN-2020-1023

GUIMARÃES, K. L. A. *et al.* Codificação de barras de DNA e filogeografia do complexo de espécies *Hoplias malabaricus*. **Relatórios Científicos**, v. 12, n. 1, p. 5288, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-09121-z

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society Lond B Biol Sci**, v. 270, p. 313-321. 2003.

HENRIQUES, J. M. **Identificação molecular (DNA BARCODE) dos peixes da bacia do Rio Ribeira de Iguape e dos Rios Costeiros do Estado de São Paulo.** 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia)). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo.

HALL, T. A. Bioedit a user-friendly bilogical sequence aligment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series,** v. 1, n. 41, p. 95-98, 1999. Disponível em: https:// https://encurtador.com.br/wytBh. Acesso em: 18 de maio de 2024.

HUBERT, N. *et al.* Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. 1-18, 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0002490

KIMURA, M. A. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution,** v. 16, n. 1, p. 111-120, 1980. Disponível em: ink.springer.com/article/10.1007/bf01731581. Acesso em: 09 de fevereiro de 2024.

KOERBER, S. *et al.* Checklist of the freshwater fishes of Maranhão, Brazil (CLOFFBR-MA**). Ichthyological Contributions of PecesCriollos,** v. 79, n. 1, p. 1-94, 2022.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. Mega x: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution,** v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018. Disponível em: https://encurtador.com.br/RcBs3. Acesso: 16 de janeiro de 2024.

LIMEIRA FILHO, D. *et al.* Molecular evidence reveals taxonomic uncertainties and cryptic diversity in the neotropical catfish of the genus Pimelodus (Siluriformes: Pimelodidae). **Biology**, v. 13, n. 3, p. 162, 2024. DOI: 10.3390/biology13030162

MARANHÃO. Governo do estado do Maranhão/Universidade Estadual do Maranhão/Centro de Ciências Agrárias/Núcleo Geoambiental. **Bacias hidrográficas e Climatologia no Maranhão.** 1ª ed. São Luís: Nugeo, p. 165, 2016.

MARQUES, D. F. *et al.* Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, Hoplias malabaricus (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 459-466, 2013. DOI: 10.1590/S1679-62252013000200015

MALABARBA, L. R.; REIS, R. E. Manual de técnicas para a preparação de coleções zoológicas. **Sociedade Brasileira de Zoologia,** v. 36, n. 1, p. 1-14, 1987.

MÉRONA, B. **Os Peixes E a Pesca No Baixo Tocantins,** v. 1, p. 304–318, 2010b.

NASCIMENTO, M. H. S. *et al.* DNA barcoding reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itapecuru Basin in Maranhão, Brazil. **Genetics and molecular research,** v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15038476

NASCIMENTO, M. H. S. *et al.* The DNA barcode reveals cryptic diversity and a new record for the genus Leporinus (Characiformes, Anostomidae) in the hydrographic basins of central northern Brazil. **PeerJ**, v. 11, n.1, p. e15184, 2023. DOI: 10.7717/peerj.15184

OYAKAWA, O.T. Peixes de Riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 3, p. 377, 2006. DOI: 10.1590/s1679-62252006000300012

PEREIRA, T. L. *et al.* Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 5, p. 905-91, 2017. DOI: 10.1111/jbi.12044

PIRES, W. M. M.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. DNA Barcoding unveils cryptic lineages of Hoplias malabaricus from Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p 917-927. 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.231598

POLAZ, C. N *et al.* Fishes from the Parque Nacional do Pantanal Matogrossense, upper Paraguai River basin, Brazil. **Check List**, v. 10, n. 1, p. 122-130, 2014. DOI: 10.15560/10.1.122

PUILLANDRE, N. *et al.* ASAP: Assemple species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources,** v. 21, n. 2, p. 609-620, 2020. DOI: 10.1111/1755-0998.13281

PUILLANDRE, N. *et al.* ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology Resources,** v. 21, n. 8, p. 1864-1877, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x

RAMBAUT, A. Figtree v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edimburgh. Disponível em: https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree.

RAMBAUT, A. *et al.* BEAST: software-Bayesian evolutionary analysis sampling trees. **Tracer,** v. 6, 2014b.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. Bold: The Barcode of Life Data System. **Molecular Ecology Notes,** v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Biodiversidade e Conservação de Peixes na América do Sul. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47. 2016. DOI: 10.1111/jfb.13016

ROSSO, J. *et al.* Integrative taxonomy reveals a new species of the Hoplias malabaricus species complex (Teleostei: erythrinidae). August 2018 **Ichthyological Exploration of Freshwaters** v. 28, n. 3, p. 1-20. DOI: 10.23788/IEF-1076.

SAITOU, N.; NEI, M. The Join-joining method: a new method for the neighborhood of phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution,** v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. DOI: 10.1073/pnas.74.12.546

SMITH, P. J.; MCVEAGH, S. M.; STEINKE, D. DNA *barcoding* for the identification of smoked fish products. **Journal of Fish Biology,** v. 72, n. 2, p. 464-471, 2008. DOI: 0.1111/j.1095-8649.2007.01745

SOARES, É. C. **Peixes do Mearim, Fish of the Mearim River.** 1 ed. São Luís: Ed. Instituto Geia, 2005.

STAMATAKIS, A. RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and PostAnalysis of Large Phylogenies. **Bioinformatis Applications Note,** v. 30, n. 9, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033

SUCHARD, M. A. *et al.* Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. **Evolution,** v. 4, n. 1, p. 1-5, 2018. DOI: 10.1093/ve/vey016

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. Modern Applied Statistics with R. Springer. https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/

VIEIRA, L. O *et al.* Checklist of the fish fauna oftheMunimRiverBasin,Maranhão, north-eastern Brazil. **Biodiversity Data Journal**, v. 11, n. 1, p. 2-37, 2023. DOI: 10.3897/BDJ.11.e98632

WARD, R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society** B.; v. 360, n. 1462, p. 1847-1857. 2005. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of fish biology**, v. 74, n. 2, p. 329-356, 2009. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x

ZHANG, J. *et al.* A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics,** v. 29, n. 22, p. 2869-2876, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt499

CAPÍTULO 6

MÉTODOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO UTILIZADOS NA AGRICULTURA

GENETIC IMPROVEMENT METHODS USED IN AGRICULTURE

Alberto dos Reis Fialho
Estudante de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá-MT, Brasil

Alexsander Silva Alves
Estudante de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá-MT, Brasil

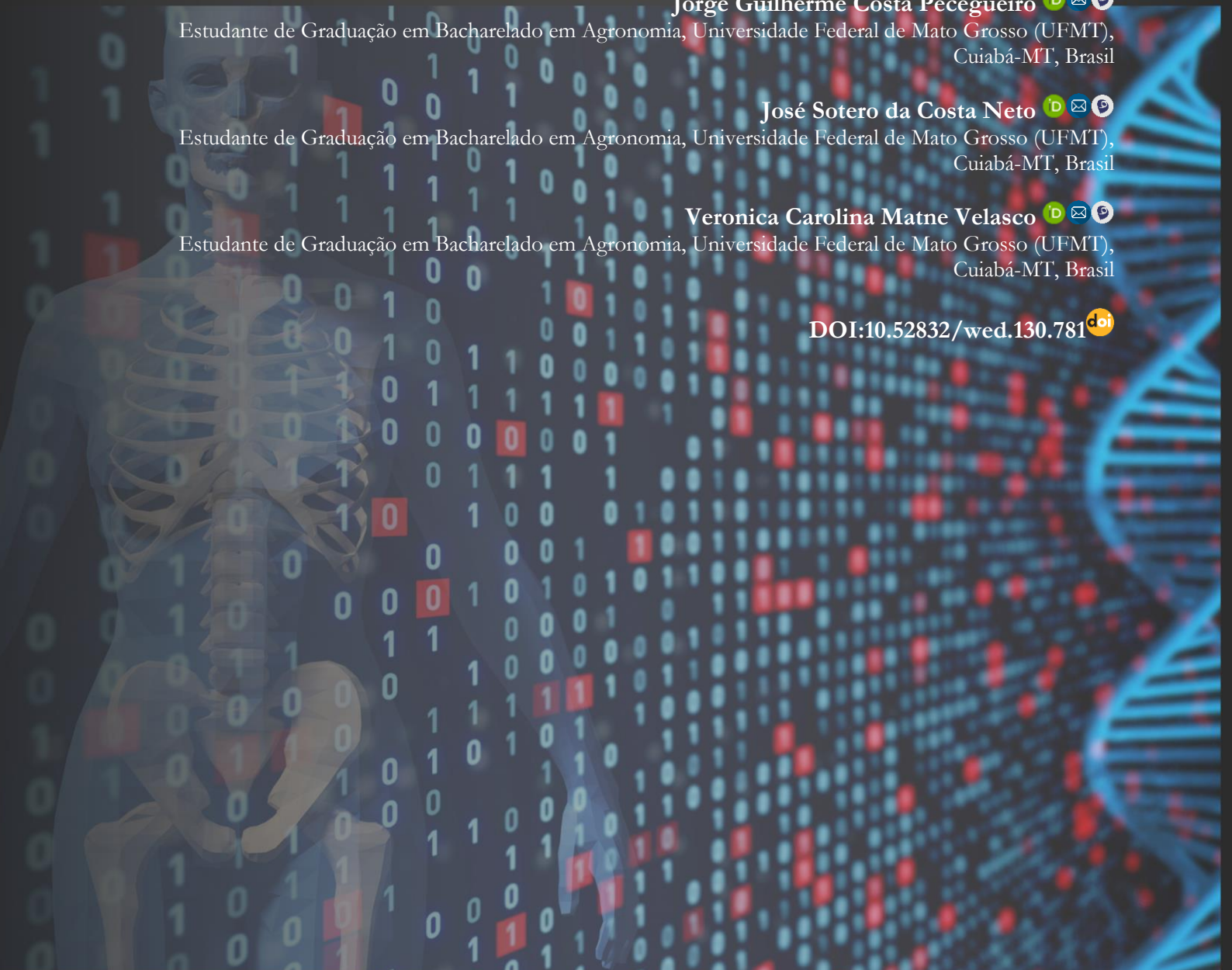
Arthur Aquino Chagas
Estudante de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá-MT, Brasil

Jorge Guilherme Costa Pecegueiro
Estudante de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá-MT, Brasil

José Sotero da Costa Neto
Estudante de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá-MT, Brasil

Veronica Carolina Matne Velasco
Estudante de Graduação em Bacharelado em Agronomia, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá-MT, Brasil

DOI:10.52832/wed.130.781



Resumo: Este capítulo objetiva esclarecer a problemática que permeia a seleção do método mais eficiente para melhoramento genético, apresentando os principais métodos utilizados na agricultura brasileira: seleção massal, método *bulk* e método genealógico. A metodologia adotada consiste em uma revisão de literatura de produções acadêmico-científicas publicadas entre o período de 1980 a 2022. Os dados obtidos permitem extrair que a aplicabilidade de cada método dependerá do objetivo específico da seleção e das condições do ambiente de cultivo. A seleção massal, caracterizada por seu custo financeiro reduzido e demanda mínima de mão de obra, proporciona uma contribuição significativa para o processo de seleção natural. De maneira similar, o método *bulk* se destaca por seu custo financeiro acessível e pela baixa exigência de trabalho manual, embora não elimine totalmente os tipos genéticos menos desejáveis. Em contrapartida, o método genealógico, embora economicamente oneroso e lento, promove um aprimoramento mais sofisticado e refinado no processo de seleção genética. Dessa forma, os resultados alcançados permitem concluir que cada método possui vantagens e desvantagens específicas, de modo que a escolha da técnica mais adequada dependerá do contexto genético e dos objetivos pretendidos no programa de melhoramento.

Palavras-chave: Agricultura brasileira. Método *bulk*. Método genealógico. Seleção genética. Seleção massal.

Abstract: This chapter aims to clarify the challenges in selecting the most efficient method for genetic improvement, focusing on the main techniques used in Brazilian agriculture: mass selection, *bulk* method, and pedigree method. The approach involves a review of academic and scientific literature published between 1980 and 2022. The findings indicate that the suitability of each method depends on the specific goals of the selection and the environmental conditions of the cultivation. Mass selection, known for its low cost and minimal labor requirements, significantly contributes to natural selection. Similarly, the *bulk* method is recognized for its affordability and low manual labor needs, although it does not entirely eliminate less desirable genetic types. Conversely, the pedigree method, while more costly and time-consuming, offers a more sophisticated and refined genetic selection process. Thus, the results suggest that each method has its own advantages and disadvantages, and the choice of the most appropriate technique should be based on the genetic context and the goals of the improvement program.

Keywords: *Bulk* method. Genetic selection. Mass selection. Pedigree method. Qualitative traits.

1 INTRODUÇÃO

De início, esclarece-se que as plantas desempenham um papel fundamental para a humanidade, especialmente para alimentação direta e indireta, sendo, neste caso, fonte de alimento para animais que, por sua vez, fornecem alimentos. Da mesma forma, são massivamente utilizadas em diversos setores produtivos, como: matéria-prima para vestuário (algodão, linho, rami); energia (na forma de madeira, etanol ou biodiesel); medicina (aspirina – isolada do salgueiro branco); e construção (madeira) (Bespalhok; Guerra; Oliveira, 1999).

Conforme entendimento de Borém e Miranda (2013), a crescente preocupação com a disponibilidade de recursos acentua-se pelo significativo aumento populacional, com estimativa

de 9 bilhões de indivíduos no ano de 2050. Tal conjuntura acarretaria um aumento de 60% na produção agrícola em um período ínfimo de apenas 38 anos, implicando na necessidade adicional de um bilhão de toneladas de cereais e 200 milhões de toneladas de carne por ano.

Segundo Bespalhok, Guerra e Oliveira (1999), existem duas abordagens principais para aumentar a produção de alimentos: a expansão da área cultivada por meio da incorporação de novas terras e o aumento da produtividade.

Posto isso, a abordagem mais econômica e sustentável para incrementar a produtividade seria a obtenção de cultivares com maior potencial produtivo. À título exemplificativo da eficácia do melhoramento genético na produtividade das plantas, tem-se o milho nos Estados Unidos, cuja produtividade aumentou em sete vezes entre 1936 e 1996 (Bespalhok; Guerra; Oliveira, 1999).

Figura 5 - Produtividade de milho nos Estados Unidos da América no período de 1866 a 1996.

Fonte: Bespalhok, Guerra e Oliveira, 1999.

O melhoramento genético de plantas revela-se fundamental para o crescimento da produtividade das culturas agrícolas, além de fornecer resistência a doenças e insetos. Nesse contexto, estabelece-se o objetivo desse trabalho: fazer uma revisão de literatura sobre os principais métodos de melhoramento genéticos utilizados na agricultura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho utiliza a metodologia de revisão de literatura, definida por Dorsa (2020) como de extrema importância para a escrita científica, utilizando para isso fontes como artigos, teses, congressos científicos e livros da área de referência.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Com o intuito de se garantir a qualidade deste trabalho foram pesquisadas 40 fontes diferentes, entre livros de referência na área de melhoramento genético voltados para a agricultura, artigos científicos em plataformas de qualidade como SciELO e teses de dissertação sobre o tema. Por fim, elaborou-se esse capítulo com base em 12 fontes da literatura que se destacaram durante a pesquisa, com a determinação do período de pesquisa de 1980 a 2022.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método de seleção massal

A seleção massal é um dos métodos mais antigos de melhoramento de plantas, sendo caracterizada pela escolha e preservação de plantas com características desejáveis realizadas pelos primeiros agricultores, processo que resultou no aumento da frequência de alelos favoráveis dentro das populações. Destaca-se que a eficácia da seleção massal é maximizada em populações heterogêneas, compostas por uma mistura de linhas puras no caso das espécies autógamas, ou por indivíduos heterozigóticos em espécies alógamas, e quando aplicada a características com alta herdabilidade (Borém; Miranda, 2013).

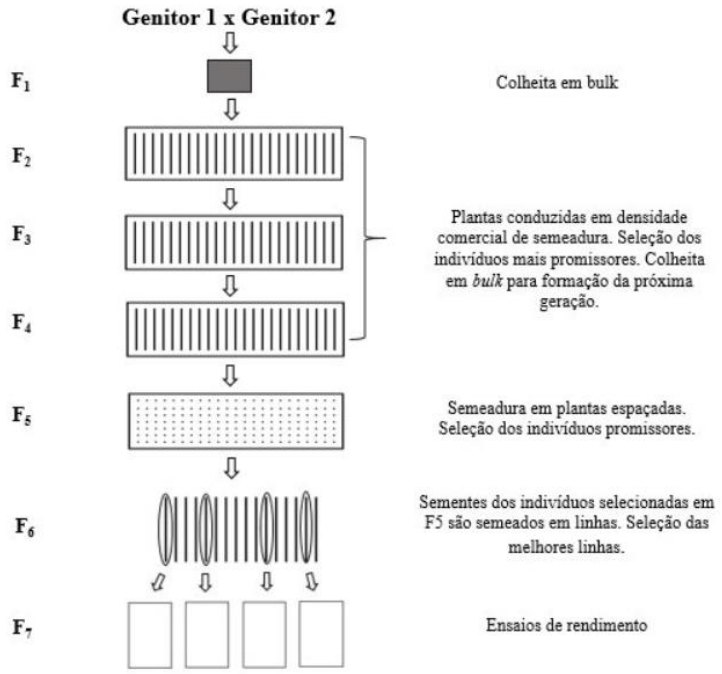
De acordo com Borém e Miranda (2013), o princípio fundamental da seleção massal é a escolha dos fenótipos superiores, visando a elevação da média geral da população ao consolidar os melhores fenótipos. A seleção massal pode ser dividida em duas categorias: positiva e negativa. A seleção massal positiva visa a identificação e agrupamento de indivíduos com características desejáveis para formar uma nova população ou cultivar. Em contraste, a seleção massal negativa tem como objetivo a eliminação de indivíduos indesejáveis, preservando apenas os remanescentes adequados.

Para as espécies alógamas, os campos de seleção devem ser isolados de outras áreas da mesma espécie para evitar a polinização indesejada, mantendo distâncias de 200 a 300 metros das espécies polinizadas por insetos e 500 metros das polinizadas pelo vento (Borém; Miranda, 2013).

A seleção massal é vantajosa por seu menor custo e menor demanda de mão de obra, além de promover uma significativa contribuição da seleção natural influenciada pelas condições do ambiente de cultivo. As populações são semeadas em densidade comercial nas gerações F2 a F4, com as melhores plantas sendo selecionadas e misturadas. Na geração F5, a semeadura é espaçada, e a seleção baseada no fenótipo origina a geração F6, na qual, na geração F7, são realizados ensaios de competição para avaliar o desempenho dos cultivares (Scheeren *et al.*, 2011).

A figura a seguir ilustra a estrutura deste método:

Figura 6 - Fluxograma da seleção massal.



Fonte: Carvalho (2022) adaptado Allard (1971).

3.2 Método populacional ou "*bulk*"

Sobre o método da população, Nilsson-Ehle quem deu início aos estudos no ano de 1908, na Suécia, mas foi Newman quem deu continuidade ao trabalho, escrevendo sobre as vantagens do método e apresentando-o para uma reunião de melhoristas no Canadá (Borém; Miranda, 2013).

Na agricultura, tal método é usado majoritariamente em espécies autógamas e, através da seleção natural, fundamenta-se na habilidade de competição das plantas associada a produtividade da mesma em uma população heterogênea. Em adição, pelo fato de a maior proporção do método ser feito em ambiente de cultivo ou em condições edafoclimáticas semelhantes a ao local que se queira cultivar, o melhorista deve ficar atento a escolha do ambiente que favoreça as qualidades que deseja (Borém; Miranda, 2013).

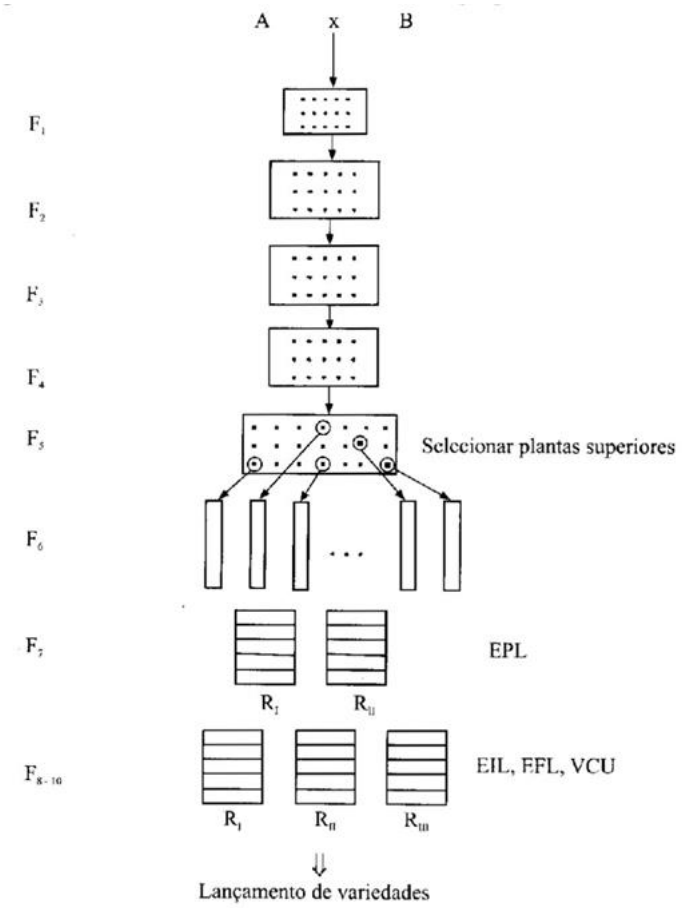
A utilização na agricultura possui grande importância pois o método da população é usado como melhoramento genético nas culturas de maior produção e importância econômica no Brasil, sendo mais utilizada em: soja, feijão que foi a primeira cultura que se sabe a utilizar o método *bulk* no Brasil, sorgo do tipo macho-esterilidade genética (GMS), e por fim podendo também ser utilizado como melhoramento do arroz irrigado que antes havia dificuldade devido a

variação de porte da cultura, porém atualmente tem maior uniformidade no porte da cultura possibilitando o melhor uso do método *bulk*. (Gilioli; Almeida; Kiihl, 1980; Raposo; Ramalho; Abreu, 2000; Cordeiro, 2008; Menezes, 2021).

O método começa com a hibridação dos genitores escolhidos de acordo com a finalidade do programa, e cruzamento deles. Em F1, geração subsequente do cruzamento citado anteriormente, a condução deve favorecer a obtenção do maior número de sementes as quais serão colhidas em *bulk* e originará a geração F2, a partir de tal geração é necessário que as condições edafoclimáticas sejam semelhante ao de cultivo incluindo as práticas agrícolas ao qual a cultivar será inserida, as sementes F3 em *bulk* irão desenvolver a geração F3, que seguirá o mesmo desenvolvimento da geração F2, repete-se esse procedimento até que se consiga o nível de homozigose desejada. O grau de divergência genética entre os pais vai determinar o número de gerações a serem conduzidas, após chegar à homogeneidade faz-se o plantio de forma mais espaçada com as sementes colhidas em *bulk* a fim de selecionar e identificar as plantas com o fenótipo de acordo com o desejado, após isso, as sementes, coletadas em *bulk* das plantas selecionadas como superiores serão trilhados separadamente e as plantas escolhidas serão enfileiradas para prosseguir com teste em progênie e a fileira mais uniforme para as qualidades agronômicas esperadas são colhidas em *bulk* e analisadas em ensaio preliminar de linhagem (EPL) que é a primeira análise de produtividade das possíveis cultiváveis, após isso ocorre outra avaliação com as Linhagens mais promissoras no ensaio intermediário de avaliação de Linhagens (EIL) semelhante ao EPL porém mais rigoroso, este teste é feito em duas ou três localidades com semelhanças na área de cultivo e por fim passa pela última análise das linhagens que melhor se desempenharam o ensaio final de avaliação de linhagens (EFL) que diferente do último, será conduzido em cinco ou mais áreas que representam o local de cultivo. A seguir de dois anos sendo realizados as análises de diferentes linhagens em testes de produtividade e determinar o valor de cultivo e uso (VCU), aquelas que se destacarem poderão ser oficialmente registradas, protegidas e disponibilizadas (Borém; Miranda, 2013).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Figura 7 - Esquema do método da população.



Fonte: Borém e Miranda, 2013.

Além dos fatos citados, o método populacional possui diversas vantagens que estimula os melhoristas a escolhê-lo, como: necessidade de pouca mão de obra, fácil condução para se chegar a homozigose de uma linhagem, possibilidade da condução de um maior número de populações quando comparado a outros métodos, além de amplificar o aparecimento de plantas com maior adaptação e competição (Gilioli; Almeida; Kiihl, 1980; Borém; Miranda, 2013; Bertoldo; Silva; Favreto, 2016).

Quanto as desvantagens, pela atividade da seleção natural pode favorecer o desenvolvimento de plantas com características indesejáveis e da possibilidade da deriva genética caso ocorra erro na condução de amostragens, além do mais, tal método não elimina totalmente os tipos inferiores na seleção natural, no caso da soja, como o acamamento, debulhas das vagens e suscetibilidade a doenças, porém, o melhorista para minimizar as últimas desvantagens pode colocar as populações sob ataque de insetos pragas e em condições de doenças para fazer com

que diminua os descendentes das plantas suscetíveis (Gilioli; Almeida; Kiihl, 1980; Pípolo *et al*, 2007; Bertoldo; Silva; Favreto, 2016).

3.3 Método genealógico ou pedigree

Inicialmente proposto por Herman Nilsson-Ehle, o método genealógico ou pedigree fora baseado na seleção individual com base na progênie dos indivíduos, atingindo seu ápice de popularidade na década de 70 no desenvolvimento de espécies autógamas. Ainda assim, com o tempo o método também fora utilizado para espécies alógamas (Borém; Miranda, 2013; Bertoldo; Silva; Favreto, 2016).

Tal método tem como fundamento a avaliação pelo genótipo do indivíduo, baseando-se na seleção individual de plantas com base na sua genealogia, utilizando teste de progênies avaliando individualmente e separadamente cada progênie dos indivíduos da população segregante. Com isso é necessário conhecimento sobre a árvore genealógica dos indivíduos, exigindo grande conhecimento sobre a cultura e alta dedicação do melhorista (Borém; Miranda, 2013).

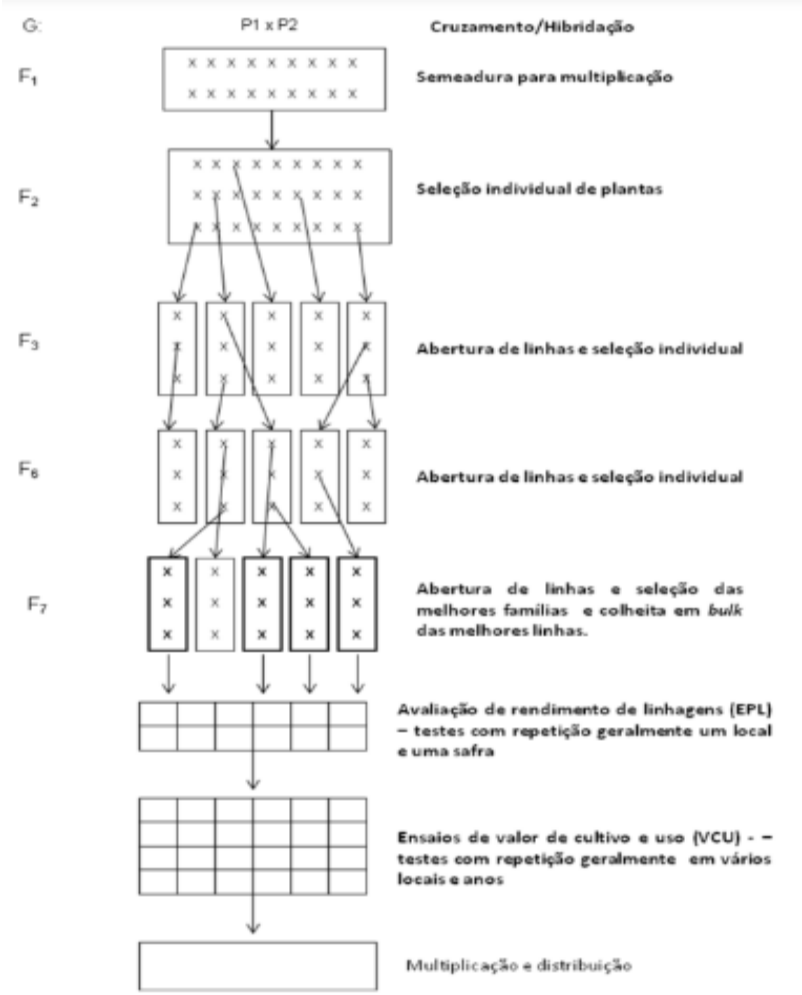
Tais características do método permitem o registro genealógico de cada linha, desde a seleção individual a partir das gerações F2 até os ensaios, estabelecendo grau de parentesco de cada linha, isso somado com o acesso a genealogia dos indivíduos permite o descarte prévio de plantas com alto grau de parentesco visto que a busca é por um indivíduo heterozigoto (Borém; Miranda, 2013; Menezes *et al*., 2021).

O método do pedigree tem semelhança com o método *bulk* desde a escolha dos genitores até a geração F2, além do início, os ensaios também são conduzidos semelhantemente com o método *bulk*, sendo eles os ensaios preliminares de produtividade (EPL), os ensaios intermediários de avaliação de linhagem (EIL) e os ensaios finais de avaliação de linhagem (EFL). (Borém; Miranda, 2013).

A partir da geração F2 seleciona individualmente as plantas fenotipicamente superiores, assim semeando-se as sementes de cada planta selecionada em fileiras. Da geração F3 até a F4, a seleção é feita dentro e entre as fileiras com base no teste de progênies, sempre considerando a avaliação individual, após a geração F4 a seleção passa ser a apenas entre as fileiras baseando-se no comportamento de cada fileira, isso ocorre pois na geração F4 o nível médio de homozigose já é alto, não sendo mais necessário a seleção individual dentro das fileiras, visto que os alelos das progênies dentro das fileiras se encontram semelhantes. A autofecundação aumenta o nível médio de homozigose das progênies. No entanto, existem ocasiões que justifiquem a utilização

de mais gerações até a seleção baseada no comportamento de cada fileira, ocasiões onde os genitores possuem alta discrepância genética, onde nesse caso a porcentagem da homozigose da geração F4 mesmo sendo alto ainda não é o suficiente para os alelos das progênies dentro das fileiras serem totalmente semelhantes, graças a diferença genética dos genitores, além do nível de diversidade genética dos genitores, os padrões de lançamento de uma cultivar estabelecidos pelo MAPPA também devem ser considerados. Normalmente são conduzidas 6 gerações até o ensaio, ou seja, após a geração F6 as linhas mais favoráveis e uniformes dever ser recolhidas em massa e direcionadas ao EPL (ensaio preliminar de produtividade) (Borém; Miranda, 2013; Menezes *et al.* 2021).

Figura 8 - Esquema do método genealógico ou pedigree.



Fonte: Bertoldo, Silva e Favreto, 2016.

As seleções do método são baseadas em características qualitativas (Scheeren *et al.*, 2011). Vamos destacar as vantagens que o método oferece, entre elas temos o conhecimento do grau de parentesco graças ao acesso a arvore genealógica, tal conhecimento maximiza o processo de seleção. Temos também o descarte de indivíduos inferiores precocemente, isso é possível graças ao teste de progênies que frequentemente é usada nas gerações precoces. Permite estudos genéticos, os dados coletados durante a realização do método possibilitam futuros estudos genéticos, além claro do acesso a árvore genealógica. Além de todas essas vantagens temos também o fato da utilização do método para o treinamento de jovens melhoristas, visto que ele permite aprimorar ainda mais a habilidade de seleção do melhorista do que em qualquer outro método (Borém; Miranda, 2013; Bertoldo; Silva; Favreto, 2016).

No entanto, o método ainda possui desvantagens que podem dificultar sua realização, entre elas temos que o tempo utilizado para sua realização, sendo um longo tempo, visto que o método deve ser conduzido nas condições edafoclimáticas que se pretende lançar o cultivar, assim cada geração deve ser conduzida na época agrícola que se deseja lançar a cultivar. Temos também o elevado custo de mão de obra, o fato de a seleção ocorrer logo na geração F2 há a necessidade de quantidade considerável de mão de obra qualificada para sua realização. Ainda há a necessidade de grande área experimental, devido ao grande espaçamento entre as plantas semeadas ocorrer desde a geração F2, pois facilita a seleção das melhores plantas. Por último, destacaremos a exigência de melhoristas treinados, indivíduos qualificados e experientes para a condução do método e treinamento dos jovens melhoristas (Scheeren *et al.* 2011; Bertoldo; Silva; Favreto, 2016; Menezes *et al.* 2021).

O método do pedigree é utilizado principalmente para programas de melhoramento de cereais e leguminosas autógamas, mas também é utilizado para o melhoramento de algumas espécies alógamas, a principal delas sendo o milho (Borém; Miranda, 2013).

4 CONCLUSÃO

A análise dos métodos de seleção genética – seleção massal, método *bulk* e método genealógico – revela a diversidade de abordagens disponíveis para a melhoria genética em agronomia.

Dito isso, a seleção massal, por sua simplicidade prática, mostra-se eficaz na seleção de características desejáveis, mas pode apresentar limitações na precisão e na velocidade de progresso genético.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

O método *bulk* oferece vantagens na gestão da variabilidade genética e na seleção de características qualitativas, porém pode ser menos eficiente em ambientes de alta complexidade genética.

O método genealógico, embora mais preciso na identificação de indivíduos superiores através da análise de linhagens, pode exigir um maior investimento em tempo e recursos para a manutenção dos registros genealógicos.

A revisão dos artigos científicos demonstra que cada método tem sua aplicabilidade dependendo do objetivo específico da seleção e das condições do ambiente de cultivo. Neste prisma, a escolha do método mais adequado deve considerar não apenas os aspectos técnicos, mas também o contexto prático da aplicação, para garantir a maximização dos benefícios genéticos.

Por fim, frisa-se que a integração de diferentes métodos pode oferecer uma abordagem mais robusta para a melhoria genética, ajustando-se às necessidades específicas das culturas e aos objetivos de produção.

REFERÊNCIAS

BERTOLDO, J. G.; SILVA, R. P. da; FAVRETO, R. **Recursos vegetais e melhoramento genético**: conceitos e aplicações. Porto Alegre: Fepagro, 2016. 100 p. (Boletim Fepagro, n.26).

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao Melhoramento de Plantas. In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas. Disponível em www.bespa.agrarias.ufpr.br., p.1-9.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa: Ufv, 2013. 523 p. Disponível em: file:///C:/Users/alexs/Downloads/Melhoramento_de_Plantas_6a_ed_Aluizio_Bo.pdf. Acesso em: 12 jun. 2024.

CARVALHO, I. R. Métodos de seleção e condução de gerações segregantes para trigo. 2022. Disponível em: https://elevagro.com/blog/metodos-de-selecao-e-conducao-de-geracoes-segregantes-para-trigo/#:~:text=2%2DM%C3%A9todo%20geneal%C3%B3gico%20ou%20pedigree,formar%C3%A1%20uma%20fam%C3%ADlia%20F3.. Acesso em: 12 jun. 2024.

DORSA, A. C. O papel da revisão da literatura na escrita de artigos científicos. **Interações**, Campo Grande, v. 21, n. 4, p. 681-684, 30 out. 2020. Universidade Católica Dom Bosco. http://dx.doi.org/10.20435/inter.v21i4.3203. Acesso em: 12 jul. 2024.

GILIOLI, J. L.; ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S. Aspectos sobre o melhoramento da soja [Glycine max (L.) Merrill]. CNPSO, Londrina SP, EMBRAPA-CNPSo. Série Miscelânea, 1, 20 p. 1980.

MENEZES, C. B. (ED.). **Melhoramento Genético de Sorgo**. 1. Ed. Brasília: EMBRAPA, 2021. P. 546

PIPOLO, A. E. *et al*. **Desenvolvimento de germoplasma e cultivares de soja**. CNPSO, Londrina SP, Embrapa Soja. Circular técnica, 52, 10 p. 2007.

RAPOSO, F. V.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B. Comparação de métodos de condução de populações segregantes do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 1991-1997, out. 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1590/s0100-204x2000001000010

SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E.; SILVA, M. S.; BONOW, S. Melhoramento de trigo no Brasil. *In:* SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E.; SILVA, M. S.; BONOW, S. **Trigo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. Cap. 17. p. 427-452.

CAPÍTULO 7

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE PEIXES DA FAMÍLIA CURIMATIDAE (CHARACIFORMES) DA BACIA DO RIO ITAPECURU, MARANHÃO

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG FISH OF THE CURIMATIDAE FAMILY (CHARACIFORMES) FROM THE ITAPECURU RIVER BASIN, MARANHÃO

Katiana Carvalho dos Santos
Graduada em Licenciatura em Ciências Habilitação em Biologia pela Universidade Estadual Do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

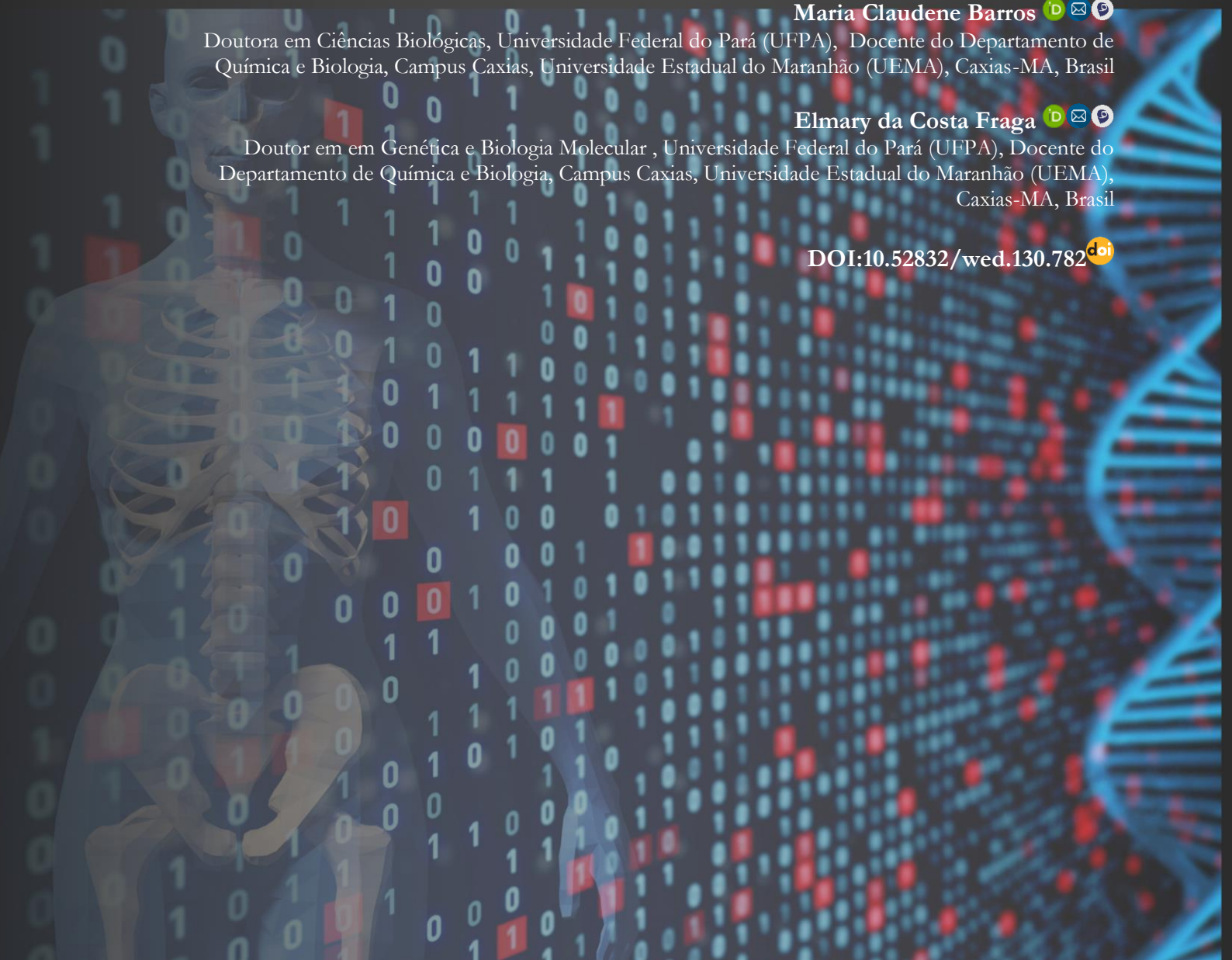
Eline Silva Lima
Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

Francisca Karoline Marinho Ferreira
Graduada em Ciências Naturais pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

Maria Claudene Barros
Doutora em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Docente do Departamento de Química e Biologia, Campus Caxias, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

Elmary da Costa Fraga
Doutor em em Genética e Biologia Molecular , Universidade Federal do Pará (UFPA), Docente do Departamento de Química e Biologia, Campus Caxias, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias-MA, Brasil

DOI:10.52832/wed.130.782



Resumo: A família Curimatidae compreende oito gêneros e cerca de 117 espécies de peixes amplamente distribuídas nas principais bacias hidrográficas da região Neotropical. Nesta família as espécies *Curimata macrops*, *Psectrogaster rhomboides* e *Steindachnerina notonota*, ocorrem com frequência na bacia do rio Itapecuru. Considerando a falta de informações que possibilitem o melhor entendimento da taxonomia do grupo, tornou-se necessário a realização de estudos visando investigar as relações filogenéticas da família Curimatidae da bacia do Itapecuru, através de sequências do DNA mitocondrial do gene rRNA 16S. O DNA foi extraído a partir do tecido muscular utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio, e a amplificação do gene rRNA 16S foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e os produtos foram sequenciados usando-se o método didesoxiterminal. Um fragmento de 579 pb do gene mitocondrial rRNA 16S foi obtido para 14 espécimes de *P. rhomboides*, 10 *C. macrops e* quatro *S. notonota.* A análise de sequências dos curimatídeos revelou a ocorrência de cinco haplótipos, sendo que em *C. macrops* foram encontrados dois haplótipos, como também, em *S. notonota,* e apenas um para *P. rhomboides*. A reconstrução filogenética gerou árvores com topologia similar fortemente suportada pelos valores de *bootstrap* nas análises realizadas, mostrando um forte agrupamento entre *C. macrops, P. rhomboides* e *S. notonota*. Os resultados do presente estudo geraram informações que confirmam o *status* taxonômico das espécies da família Curimatidae analisadas, e contribui com informações que poderão subsidiar medidas que permitam o uso sustentável deste recurso pesqueiro e a conservação dos mesmos.

Palavras-chave: Branquinha. João-duro. rRNA16S. *Steindachnerina.*

Abstract: The Curimatidae family comprises eight genera and around 117 species of fish widely distributed in the main river basins of the Neotropical region. In this family, the species *Curimata macrops*, *Psectrogaster rhomboides* and *Steindachnerina notonota,* occur frequently in the Itapecuru river basin. Considering the lack of information that would enable a better understanding of the taxonomy of the group, it became necessary to carry out studies to investigate the phylogenetic relationships of the Curimatidae family from the Itapecuru basin, through mitochondrial DNA sequences of the 16S rRNA gene. DNA was extracted from muscle tissue using the phenol-chloroform protocol, and amplification of the 16S rRNA gene was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, and the products were sequenced using the dideoxyterminal method. A 579 bp fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene was obtained for 14 specimens of *P. rhomboides*, 10 *C. macrops and* four *S. notonota.* The sequence analysis of curimatids revealed the occurrence of five haplotypes, with two haplotypes found in *C. macrops*, as well as in *S. notonota*, and only one for *P. rhomboides*. The phylogenetic reconstruction generated trees with similar topology strongly supported by the bootstrap values in the analyzes performed, showing a strong grouping between *C. macrops*, *P. rhomboides* and *S. notonota.* The results of the present study generated information that confirms the taxonomic status of the species of the Curimatidae family analyzed and contributes with information that could support measures that allow the sustainable use of this fishing resource and its conservation.

Keywords: white. João-duro. rRNA16S. *Steindachnerina.*

1 INTRODUÇÃO

Os peixes da Ordem Characiformes compreendem um grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul, e apresentam destacada importância na pesca comercial e de subsistência (Britski, 1999), sendo vulgarmente chamados de peixes de escamas. A ordem agrupa

cerca de 14 famílias, 240 gêneros, e aproximadamente 1460 espécies, e sua maior diversificação é encontrada na região Neotropical (Santos *et al*., 2004; Calcagnotto; Schaefer; DeSalle, 2005), sendo que na Amazônia ocorre mais da metade de suas espécies.

A família Curimatidae compreende oito gêneros, *Curimata*, *Curimatella*, *Curimatopsis*, *Cyphocharax*, *Potamorhina*, *Psectrogaster*, *Pseudocurimata*, e *Steindachnerina* e cerca de 117 espécies amplamente distribuídas nas principais bacias hidrográficas da região Neotropical (Vari, 1988; Vari, 2003; Nelson, 1994; Fricke; Eschmeyer; Van Der Laan, 2024). Os curimatídeos são peixes de pequeno porte (Britski, 1999). No geral apresentam entre 80 e 150 mm de comprimento, alcançando até mais de 200 mm. Não possuem dentes nas maxilas (Britski, 1999; Britski, *et al.* 2019) e, geralmente, não possuem rastros. A linha lateral é normalmente completa e as escamas são ciclóides, podendo ter a borda posterior lisa, crenulada ou denteada (Britski, 1999).

Os representantes desta família apresentam corpo relativamente elevado ou fusiforme, boca terminal ou subinferior com ausência de dentes. Rastros branquiais ausentes ou rudimentares e abertura branquial unida ao ístimo. A maioria dos curimatídeos forma grandes cardumes de hábito detritívoro e quase sempre diurno, empreende migrações tróficas e reprodutivas; são muito abundantes e utilizadas na pesca comercial e também na aquariofolia (Giora; Fialho, 2003; Santos *et al*., 2004).

O gênero *Psectrogaster* (Eigenmann; Eigenmann, 1889) apresenta região pós-ventral quilhada com as escamas terminando num processo espiniforme e corpo uniformemente claro (Santos *et al*., 2004). A espécie *Psectrogaster rhomboides* (Eigenmann; Eigenmann, 1889) popularmente conhecida como branquinha, choradeira, branquinha do olhinho e birú, encontra-se também distribuída no Norte e Nordeste do Brasil (Santos *et al.,* 2004) (Figura 1).

O gênero *Curimata* (Bosc, 1817) inclui indivíduos que são caracterizados por possuírem corpo curto, alto, comprimido, e revestido de escamas prateadas. A espécie *Curimata macrops* (Eigenmann; Eigenmann, 1889) encontra-se distribuída no Norte e Nordeste do Brasil (Figura 1), sendo endêmica da bacia do Parnaíba. Esta espécie é conhecida como branquinha, tapiaca e branquinha do olhão (Santos *et al*., 2004; Feitosa; Teixeira, 2007).

O gênero *Steindachnerina* (Fowler, 1906) apresenta linha lateral completa; região pós-ventral quilhada, sempre sem espinho; nadadeira caudal com escamas somente na base (Britski, 1999). *Steindachnerina notonota* (Miranda - Ribeiro, 1937), conhecido como João-duro é encontrado em vários rios do Nordeste do Brasil (Britski, 1999) (Figura 1).

Vari (1983) ao realizar análises filogenéticas com characiformes das famílias Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Chilodontidae, descreveu caracteres anatômicos

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

compartilhados entre as mesmas, e sugeriu que a familia Curimatidae é o grupo irmão de Prochilodontidae, pois compartilha mais características anatômicas, evidenciando que a linhagem formada por essas duas famílias está mais próxima que Anostomidae e Chilodontidae. Os mesmos resultados permitiram considerá-los um grupo monofilético além de serem considerados grupos irmãos.

Figura 1 – Espécimes da família Curimatidae, provenientes da bacia do rio Itapecuru.

Curimata macrops (Eigenmann &Eigenmann, 1889)

Psectrogaster rhomboides (Eigenmann & Eigenmann, 1889)

Steindachnerina notonota (Miranda Ribeiro 1937)

Fonte: Fraga e Barros, 2023.

O DNA mitocondrial (mtDNA) de peixes de água doce é constituído de uma molécula circular de fita dupla, onde são descritos 37 genes dos quais dois codificam RNAs ribossômicos,

13 codificam proteínas e 22 codificam a formação dos RNAs transportadores e uma região não codificadora chamada de região controle ou alça D (*D-loop*) (Zhang *et al.*, 2023). Seu tamanho é de aproximadamente 16.600 pares de bases, porém muito importante para o metabolismo celular. Apresenta organização genômica compacta, ausência de íntrons, poucas regiões intergênicas, haploidia, ausência de recombinação, alta eficiência. Além disso, raramente apresenta seqüências nucleotídicas duplicadas e sequências não codificadoras (Zhang *et al.*, 2023).

Estudos taxonômicos de peixes têm explorado bastante o DNA mitocondrial. Assim, o gene mitocondrial rRNA 16S tem se mostrado como um bom marcador na diferenciação de vários grupos de peixes, como também em estudos comparativos intergenéricos e interespecíficos (Tringali *et al.*, 1999; Farias; Ortí; Meyer, 2000; Santos; Schneider; Sampaio, 2003; Fraga *et al.*, 2007).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e obtenção das amostras

A bacia do rio Itapecuru situa-se na parte centro-leste do Estado do Maranhão, entre as coordenadas 2° 51' a 6° 56' Latitude S e 43° 02' a 43° 58' Longitude W, com uma área de 52.972,1 Km², correspondendo aproximadamente 16% das terras do Maranhão (Figura 2). O rio nasce nos contrafortes das serras da Crueira, Itapecuru e Alpercatas, em altitudes em torno de 500m, percorrendo uma extensão de aproximadamente 1.050 km, até sua desembocadura na baia do arraial, ao sul da ilha de São Luís/MA, e está caracterizado fisicamente em três regiões distintas: Alto (da nascente até o município de Colinas), Médio (do município de Colinas até o município de Caxias) e Baixo Itapecuru (do município de Caxias até a foz na baia de São José) (Alcântara, 2004).

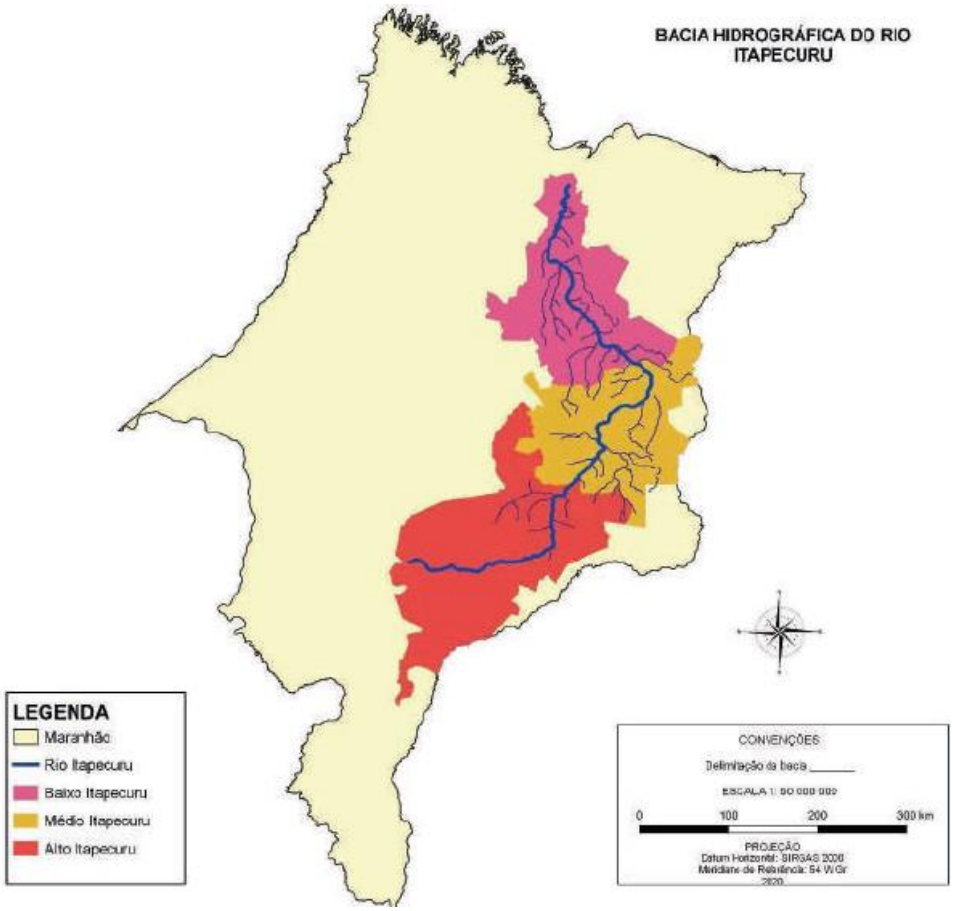
Foram realizadas oito coletas (junho/2006, outubro/2006; fevereiro/2007, maio/2007, agosto/2007 e novembro/2007, março/2008, setembro/2008) ao longo da bacia do rio Itapecuru compreendendo o alto, médio e baixo curso com duração de cinco dias para cada coleta (Tabela 1). As campanhas de coletas foram devidamente autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por meio da licença 02012.004159/2006.

Para a coleta foram utilizadas redes de malhadeiras de vários milímetros, tarrafas e espinhéis. Os espécimes foram levados para o Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL), situado no Complexo GENBIMOL da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, *Campus*

Caxias, onde foram identificados utilizando-se literatura específica (Fowler, 1941; Britski; Rosa, 1988; Piorski *et al.*, 1998; Britski, 1999).

A amostragem constituiu-se de 28 espécimes obtidos na bacia do Itapecuru (Tabela 1), e sequências do gene mitocondrial rRNA 16S de outras famílias de Characiformes foram incorporadas às análises: uma de *Prochilodus nigricans* (Prochilodontidae/AY788075), uma de *Pygocentrus nattereri* (Characidae/AY788074) retiradas do GenBank e uma seqüência de *Hoplias malabaricus* da família Erythrinidae do rio Itapecuru, todas usadas como grupo externo.

Figura 2 - Localização da área de estudo na bacia do Rio Itapecuru.



Fonte: Fraga e Barros, 2023.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Tabela 1 - Procedência das amostras de curimatídeos utilizados neste estudo**.**

Localidades/Coordenadas			Espécimes		
			C. macrops	*P. rhomboides*	*S. notonota*
Baixo Itapecuru	04°44' S	43°27' W	9	2	2
Médio Itapecuru	05°26' S	43°52' W	1	11	2
Alto Itapecuru	06°22' S	44°22' W	0	1	0
Total			10	14	4

Fonte: Elaborada pelos autores, 2004.

2.2. Caracterização Molecular

O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio, modificado a partir daquele originalmente sugerido por Sambrook, Russel (2001).

O isolamento e a amplificação da região genômica, a partir de DNA total foram realizados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os seguintes primers: 16S - L 1987 5´ - GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC -3´e 16S – H 2609 5´-CCGGTCTGAACTCAGATCACG T – 3´ (Palumbi *et al*., 1991).

Após a purificação os produtos da PCR foram sequenciados por meio do método didesoxiterminal (Sanger; Nickeln; Coulson, 1977), utilizando o Kit Big Dye TM Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Readyc Reaction em um sequenciador automático ABI Prism™ 3500.

2.3 Análises filogenéticas

As sequências do fragmento do gene rRNA 16S foram editadas e alinhadas no programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). A composição nucleotídica, o número de sítios informativos, assim como a diversidade haplotípica foram realizadas através do programa DnaSP versão 6 (Rozas *et al*., 2017). Através do MEGA X (Kumar *et al*., 2018) obteve-se matriz de divergência nucleotídica e árvores filogenéticas e a saturação dos dados foi estimada utilizando-se o programa DAMBE (Xia; Xie, 2001), plotando-se a taxa de transição e transversão versus divergência a partir do algoritmo de TN93.

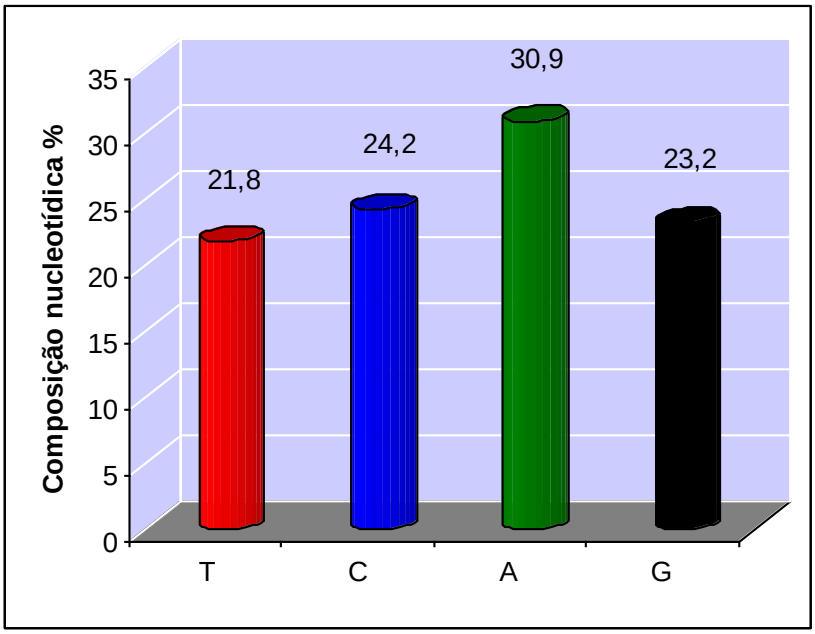
A análise filogenética usando parcimônia foi realizada utilizando-se o programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003). O programa Modeltest 3.7 (Posada; Crandal, 1998) foi usado para selecionar o modelo de evolução que melhor se ajustava aos dados, sendo selecionado o modelo GTR+G modelado pela distribuição gama com os seguintes parâmetros: Base = (0.3021 0.2409 0.2295), Nst=6 Rmat=(4.9112 12.8356 5.4790 0.0000 33.4642), Rates= gamma, Shape=0.1542 e proporção de sítios invariantes igual a zero. Os parâmetros do Modeltest foram usados nas análises de Máxima Verossimilhança (ML) e Agrupamento de Vizinhos (NJ) para reconstrução filogenética, assim como, para gerar a matriz de distância genética no programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003). O comprimento da árvore (L) e os índices de consistência (IC), índice de consistência rescalonado (RC) e índice de homoplasia (IH) foram também estimados no programa PAUP. A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). As deleções e inserções foram tratadas como dados perdidos (*missing*) em todas as análises.

3 RESULTADOS

Foi obtido um fragmento de 579 pares de bases (pb) para o gene mitocondrial rRNA 16S em 28 espécimes da família Curimatidae, provenientes da bacia do rio Itapecuru, sendo 10 da espécie *C. macrops*, 14 da espécie *P. rhomboides* e quatro *S. notonota*. Para a espécie *C. macrops* foi verificado dois haplótipos, como também, para *S. notonota*. A ocorrência de um único haplótipo foi observado para *P. rhomboides*. A composição nucleotídica encontrada no fragmento analisado foi Timina 21,8%, Citosina 24,2%, Adenina 30,9%, e Guanina 23,2% (Figura 3). A taxa de transição e transversão versus divergência foi plotada no programa DAMBE utilizando o algoritmo de TN93 e não mostrou saturação dos dados (Figura 4).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Figura 3 – Porcentagem de bases nucleotídicas do fragmento do gene mitocondrial rRNA 16S em curimatídeos.



Fonte: Autores, 2024.

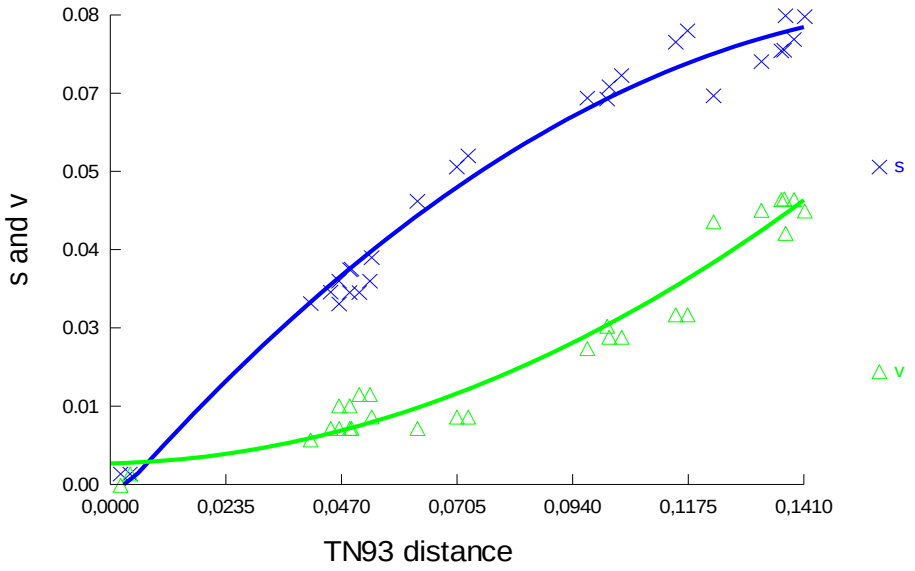
O alinhamento de 579 pares de bases para o gene mitocondrial rRNA 16S revelou 471 caracteres constantes, 61 sítios variáveis e não informativos para parcimônia e 47 sítios informativos para análise de parcimônia. Na análise de máxima parcimônia usando busca do tipo *branch and bound* gerou-se três árvores igualmente parcimoniosas com escore (L) de 142, índice de consistência (IC) = 0, 866, índice de consistência rescalonado (RC) = 0,609 e índice de homoplasia (IH) = 0,133.

A partir da matriz de divergência genética gerada no PAUP utilizando os parâmetros do Modeltest, foram observados índices de divergência nucleotídica de 6% entre *P. rhomboides* e *C. macrops*, como também, entre *S. notonota* e *C. macrops*. Valores de 4 a 5% foram observados entre *P. rhomboides* e *S. notonota*. A divergência nucleotídica intraespecifica foi sempre igual a 0%. A sequência de *Prochilodus nigricans* (Prochilodontidae) revelou uma divergência nucleotídica de 10 a 11% quando comparada com *C. macrops*, e de 8% em relação a *P. rhomboides*. No entanto, os menores valores (6 a 7%) foram observados para *P. nigricans* x *S. notonota*, evidenciando uma forte similaridade entre curimatídeos e prochilodontídeos.

Observou-se ainda, elevada divergência nucleotídica entre a seqüência de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) e as duas espécies de curimatídeos (*C. macrops* e *S. notonota*) variando de 26% a 29%. Entretanto, esta divergência foi menor em relação a *P. rhomboides* (23%).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Figura 4 - Número de transição(s) e transversão(v) versus divergência para o fragmento do gene mitocondrial rRNA 16S.



Fonte: Autores, 2024.

A reconstrução filogenética utilizando-se os métodos baseados em distância (Agrupamento de Vizinhos/NJ) e em caráter (Máxima Parcimônia/MP, Máxima Verossimilhança/ML) resultou em árvores com topologia similar e valores de *bootstrap* de 90% para as análises de Agrupamento de Vizinhos e Máxima Parcimônia, mostrando um forte agrupamento entre *C. macrops, P. rhomboides* e *S. notonota* da bacia do rio Itapecuru com a sequência de *P. nigricans* retirada do GenBank. Estes resultados mostram que a família Curimatidae e Prochilodontidae constitui um grupo muito similar como também observado pelos índices de divergência nucleotídica (Tabela 2). Observou-se ainda, menor valor de *bootstrap* (61%) para este agrupamento na análise de Máxima Verossimilhança (Figura 5). Os dois haplótipos de *C. macrops* foram fortemente agrupados com 100% de *bootstrap* em todas as análises realizadas. O clado formado pelos haplótipos de *S. notonota* apresentou valor de *bootstrap* igual a 100% para NJ e MP, e 97% para ML.

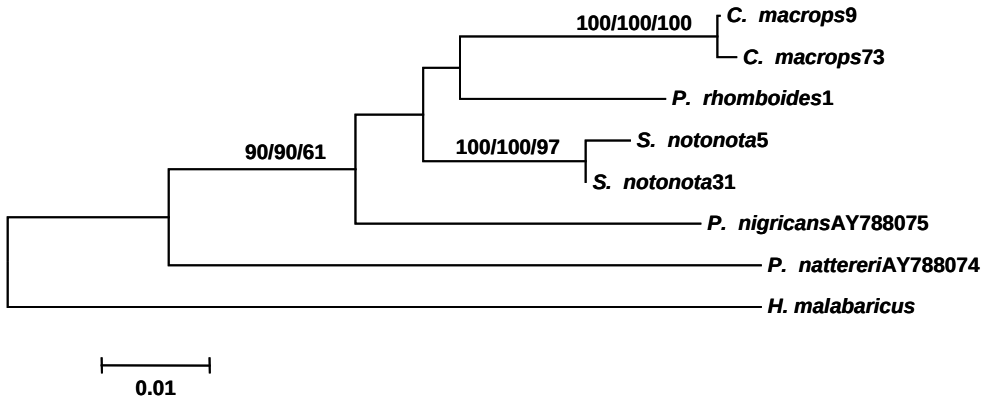
Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Tabela 2 - Percentual de divergência nucleotídica gerada através do PAUP para o gene rRNA 16S usando GTR+G com parâmetro Base = (0.3021 0.2409 0.2295), Nst=6 Rmat=(4.9112 12.8356 5.4790 0.0000 33.4642), Rates= gamma, Shape=0.1542 e Pinvar=0.

	% Divergência Nucleotídica							
Espécimes de Curimatideos	1	2	3	4	5	6	7	8
1. *C. macrops* 9								
2. *C. macrops* 73	0							
3. *P. rhomboides* 1	6	6						
4. *S. notonota* 5	6	6	5					
5. *S. notonota* 31	6	6	4	0				
6. *P. nigricans* AY788075	10	11	8	7	6			
7. *P.nattereri* AY788074	20	19	15	15	14	16		
8. *H. malabaricus*	28	29	23	28	26	29	30	

Fonte: Elaborada pelos autores, 2024.

Figura 5 – Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos (NJ) baseada em sequências do gene mitocondrial rRNA 16S, com indicação dos valores de *bootstrap* para NJ e MP e ML da esquerda para a direita respectivamente.



Fonte: Autores, 2024.

4 DISCUSSÃO

A família Curimatidae compreende oito gêneros e cerca de 117 espécies amplamente distribuídas nas principais bacias hidrográficas da região Neotropical (Vari, 1988; Nelson, 1994; Sazima; Caramaschi, 1989; Fricke; Eschmeyer; Van Der Laan, 2024). Dentre os representantes desta família, as espécies *P. rhomboides* e *C. macrops* popularmente conhecidas como branquinhas, e *S. notonota* como João-duro ocorrem com frequência na bacia do rio Itapecuru e têm sido fortemente exploradas na pesca artesanal (Vari, 1983).

Segundo Vari (1988) a sistemática e distribuição deste grupo é pouco conhecida, necessitando de estudos taxonômicos e moleculares que forneça informações que contribuam com a filogenia do grupo. Neste sentido, buscou-se investigar as relações filogenéticas da família Curimatidae da bacia do Itapecuru a partir de regiões do DNA mitocondrial (rRNA 16S) que tem se mostrado um bom marcador molecular em estudos filogenéticos de espécies de peixes (Santos, Schneider; Sampaio, 2003; Vinson *et al.*, 2004; Fraga *et al.*, 2007).

A composição de bases nucleotídicas encontrada para o gene rRNA 16S mostrou um maior percentual de adenina (30,9%) para os espécimes em estudo, um padrão bem próximo foi observado em anostomídeos (32,1% de adenina) oriundos da bacia do Itapecuru por Silva (2008a). Outros trabalhos com padrão similar aos nossos resultados têm sido reportados na literatura, como observado por Aragão, Barros, Fraga (2008) em Pimelodidae de bacias da região Nordeste com 30,9% de adenina, e por da Luz *et al.* (2008) com 31,6% de adenina em *Pygocentrus nattereri* (Characidae) da bacia do Itapecuru. Segundo Alves-Gomes *et al.* (1995) este padrão é comum em peixes.

Em nossos resultados, a análise do polimorfismo de DNA revelou a presença de dois haplótipos para as espécies *C. macrops* e *S. notonota* e um único haplótipo para *P. rhomboides*. Na caracterização genética de outros characiformes tem sido encontrados resultados similares, como em *Pygocentrus nattereri* da bacia do rio Itapecuru, utilizando-se também, sequências do DNA mitocondrial do gene rRNA 16S, por Luz, Barros, Fraga (2008) que observaram apenas um haplótipo em suas análises. Da mesma forma, em prochilodontídeos Silva *et al* (2008b) encontraram um único haplótipo analisando esta mesma região do genoma mitocondrial para *P. lacustris* da bacia do Itapecuru. No entanto, dez haplótipos foram encontrados para *L. piau* utilizando a região do genoma mitocondrial rRNA 16S por Silva; Barros; Fraga (2008a) e também por Fraga *et al.* (2014), mostrando um padrão diversificado nestes Characiformes (Anostomídeos).

Os achados de Fraga *et al.* (2014) apontaram uma baixa diferenciação genética entre as populações de *L. piau* na bacia do rio Itapecuru, sugerindo que há um fluxo gênico significativo entre elas. Esse padrão pode estar relacionado à conectividade dos habitats e à dispersão da espécie ao longo do rio, fatores que favorecem a troca genética entre indivíduos de diferentes localidades. Além disso, a manutenção de um número estável de haplótipos reforça a ideia de que as populações estão interligadas, o que pode ser essencial para sua resiliência e para a conservação da espécie frente a possíveis pressões ambientais (Santos, 2021).

A partir do fragmento do gene rRNA 16S observou-se que a divergência nucleotídica entre os haplótipos, ou seja, divergência intraespecifica foi igual a 0% (Tabela 2). Entre os táxons analisados de curimatídeos (*C. macrops*, *P. rhomboides* e *S. notonota*) os valores de divergência ficaram em torno de 4 a 6%. Observou-se ainda, que a divergência entre os haplótipos das espécies *S. notonota* com a sequência de *P. nigricans* (Prochilodontidae) retirada do Genbank ficou entre 6 a 7%, evidenciando uma forte similaridade entre curimatídeos e prochilodontídeos, corroborando os dados da literatura que afirmam o compartilhamento de características anatômicas entre estas duas famílias de Characiformes (Vari, 1983).

A reconstrução filogenética gerada a partir da análise do fragmento do gene rRNA 16S (Figura 5), mostrou clados bem suportados (100%de *bootstrap*) para as espécies estudadas. Os resultados observados nas árvores filogenéticas geradas nas diferentes análises mostram que a família Curimatidae e Prochilodontidae constitui um grupo muito similar como também, observado pelos índices de divergência nucleotídica (Tabela 2). Fraga *et al.* (2009) em um estudo com Characiformes da bacia do rio Itapecuru utilizando a mesma região do genoma mitocondrial mostraram que a família Curimatidae e Prochilodontidae estão fortemente relacionadas com baixo índice de distância genética, constituindo–se o grupo irmão da família Anostomidae.

Vari (1983) ao realizar análises filogenéticas com Characiformes das famílias Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Chilodontidae, observou vários caracteres anatômicos compartilhados entre as mesmas, e sugeriu que a família Curimatidae é o grupo irmão de Prochilodontidae, pois compartilham mais características anatômicas, que a linhagem formada por Anostomidae e Chilodontidae. Em nossos resultados a sequência de Prochilodontidae encontra-se mais próxima de curimatídeos do que de Characidae e Erythrinidae, como se observa na árvore filogenética da Figura 5, assim como, na matriz de divergência nucleotídica (Tabela 2). Portanto, os dados obtidos nesse estudo corroboraram a hipótese de que a família Curimatidae e Prochlodontidae é um grupo irmão, como tem sido sugerido por Vari (1983).

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Vari (1983) inclui o gênero *Steindachnerina* como unidade monofilética da família Curimatidae, mencionando 21 espécies distribuídas geograficamente ao longo da América do Sul, sendo *S. notonota* encontrada em vários rios do nordeste do Brasil. Apesar de seu porte reduzido e pouco valor comercial, a espécie *S. notonota* tem grande importância como elo na cadeia alimentar do ecossistema de água doce (Teixeira; Gurgel, 2004). Em nossas análises, observou-se uma maior similaridade entre *S. notonota* e *P. rhomboides* (Tabela 2 e Figura 5).

A presente análise contribuiu com informações que confirmam status específico de *C. macrops*, *P. rhomboides* e *S. notonota* (Curimatídeos) como evidenciado nas análises de divergência genética e pelos agrupamentos observados na árvore filogenética. Nossos resultados a partir do gene rRNA 16S mostraram também, a forte similaridade entre a Curimatidae e Prochilodontidae como mencionado na literatura analisando-se caracteres morfológicos (Vari, 1983). Portanto, a utilização desta região do genoma mitocondrial (rRNA 16S) foi bastante informativa em nossos estudos, gerando informações que reforçam a forte similaridade entre estas duas famílias, contribuindo com a sistemática do grupo.

5 CONCLUSÃO

O gene rRNA 16S constituiu-se um bom marcador molecular na caracterização genética de peixes da família Curimatidae, onde, possibilitou gerar árvores filogenéticas que confirmam a separação entre os táxons da família Curimatidae em clados fortemente suportados e índices de divergência nucleotídica entre as espécies da família que confirmam o *status* específico, e revelou uma baixa divergência genética entre os haplótipos encontrados para as espécies *C. macrops* e *S. notonota.*

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, E. H. Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Itapecuru, Maranhão-Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 7, n. 11, p. 97-113, 2004. Disponível em: scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=ALCÂNTARA%2C+E.+H.+Caracterização+da+bacia+hidrográfica+do+Rio+Itapecuru%2C+Maranhão-Brasil.+Caminhos+de+Geografia%2C+7%2811%29%3A+97-113%2C+2004&btnG=. Acesso em: 12 de abril de 2024.

ALVES-GOMES, J. *et al.* Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on

morphology, lectrophysiology, and mitochondrial sequence data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 298-318, 1995. Doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040204

ARAGÃO, D. G.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. Caracterização genética de *Pseudoplatystoma cf. punctifer* de bacias da região nordeste, Brasil baseado em seqüências do DNA mitocondrial. In: **54° Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador, 2008.

BRITSKI, H. A. *et al.* Revalidation and redescription of *Steindachnerina nigrotaenia* and redescription of *S. insculpta* (Characiformes: Curimatidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2019. DOI: 10.1590/1982-0224-20180076

BRITSKI, H. A. Peixes do Pantanal. Manual de identificaçao. **Brasilia: Embrapa-SPI; Corumba: Embrapa-CPAP.**, v. 184, 1999.

BRITSKI, H. A.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três-Marias. CODESVAF**, Brasília-DF, 1988.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DeSALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, n. 1, p. 135-153, 2005. DOI: 10.1016/j.ympev.2005.01.004.

LUZ, L. A.; BARROS, M. C.; FRAGA, E.Caracterização genética de *Pygocentrus nattereri* (Characidae) da bacia do rio Itapecuru/ MA. In: **54° Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador, 2008.

FARIAS, I. P.; MEYER, A.; ORTI, G. Total evidence: molecules, morphology and the phylogenetics of cichlids fishes. **Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol),** v. 288, n. 1, p. 76–92, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1097-010X(20000415)288:1<76::AID-JEZ8>3.0.CO;2-P.

FEITOSA, J. L. L.; TEIXEIRA, S. F. Ecomorfologia trófica de duas espécies simpátricas de curimatídeos (Actinopterygii, Characiformes) do reservatório de Boa Esperança, Piauí. **Neotropical Ichthyology**, v. 2, n. 1, p. 145-150, 2004. Disponível em: http://www.seb-ecologia.org.br/revistas/indexar/anais/viiiceb/pdf/471.pdf. Acesso: 15 de julho de 2024.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the *bootstrap*. **Evolution,** v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985. Disponível em: https://encurtador.com.br/vSbY6. Acesso em: 20 de fevereiro de 2022.

FRAGA, E. C., BARROS, M. C. **Peixes do rio Itapecuru: revelando sua biodiversidade**. 1 ed. Caxias-MA: EDUEMA, 2023.

FRAGA, E. C. *et al.* Variabilidade genética em ambientes naturais de *Leporinus piau* (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru. **Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 9, n. 2, p. 28-40, 2014. DOI: 10.0000/rtcab.v8i2.1121

FRAGA, E. C. *et al.* Filogenia molecular de Characiformes da bacia do Itapecuru, Maranhão. In: **55° Congresso de Genética**, Águas de Lindóia, 2009.

FRAGA, E. C. *et al.* Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, n. 1, p. 598-604, 2007. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2007.00911.x

FOWLER, H. W. A collection of fresh-water fishes obtained in eastern Brazil by Dr. Rodolpho von Ihering. **Proceedings Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 93, n. 1, p. 123-199, 1941. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/4064332. Acesso em: 22 de março de 2024.

FRICKE, R; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **Catálogo fishes: genera species, references.** Disponível em: http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp Acesso em: 28 de jul. 2024.

GIORA, J.; FIALHO, C. B. Biologia alimentar de *Steindachnerina brevipinna* (Characiformes, Curimatidae) do Rio Ibicuí-Mirim, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 93, n. 3, p. 277-281, 2003. DOI: 10.1590/S0073-47212003000300007

HALL, T. A. Bioedit a user-friendly bilogical sequence aligment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series,** v. 1, n. 41, p. 95-98, 1999. Disponível em: https:// https://encurtador.com.br/wytBh. Acesso em: 18 de maio de 2024.

KUMAR S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, v. 35, n. 6, p. 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3 ed. New York.: John Wiley & Sons, Inc., 1994.

PALUMBI, S. *et al.* **The simple fool's guide to PCR, verseon 2.0**. Uneversity of Hawaii, Honolulu, 1991.

PIORSKI, N. M.; Castro, A. C. L.; Pereira, L. G.; Muniz, M. E. L. Ictiofauna do trecho inferior do Rio Itapecuru, Nordeste do Brasil. **Boletim do Laboratorio de Hidrobiologia**, v. 11, n. 1, p. 15-24, 1998. DOI: https://doi.org/10.18764/

POSADA, D. & CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, n. 9, p. 817-818, 1998. Disponível em: https://encurtador.com.br/blqej. Acesso em: 16 de janeiro de 2024.

ROZAS, J. *et al.* DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets**. Molecular Biology and Evolution,** v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2017. DOI: 10.1093/molbev/msx248.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. DOI: 10.1073/pnas.74.12.546

SANTOS, E. W. **Redução cariotípica em espécies da família Apogonidae (Kurtiformes): rearranjos envolvidos e associação com aspectos biológicos do grupo.** 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução). Programa de Pós-Graduação em Sistemática e Evolução, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of Macrodon ancylodon (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n. 2, p. 151-161, 2003. DOI: 10.1590/S1415-47572003000200008

SANTOS, G. M.; MÉRONA, B.; JURAS, A. A.; JÉGU, M. **Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica de Tucuruí**. Brasília-DF: Editora Eletronorte, 2004.

SAZIMA, I.; CARAMASCHI, É. P. Comportamento alimentar de duas espécies de Curimata, sintópicas no Pantanal de Mato Grosso (Osteichthyes, Characiformes). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p. 325-333. 1989.

SILVA, L. M. M. **Caracterização Molecular e Variabilidade Genética de Peixes da Família Anostomidae da bacia do Rio Itapecuru-MA.** 2008. 168 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas Licenciatura). Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, 2008a.

SILVA, L. M. M..; BARROS, M. C.; FRAGA, E. Identificação do estoque de curimatá da bacia do rio Itapecuru/MA a partir de marcadores moleculares. In: **54° Congresso de Genética**, Salvador, 2008b.

SWOFFORD, D. L. PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. version 3.1. **Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey**, 1993.

TEIXEIRA, J. L. A.; GURGEL, H. C. B. Dinâmica da nutrição e alimentação natural de Steindachnerina notonota (Miranda-Ribeiro 1937) (Pisces Curimatidae), Açude de Riacho da Cruz, Rio Grande do Norte, Brasil. **Zoociências**, v. 6, n. 1, p. 19-28, 2004. Disponível em: https://periodicos.ufjf.br/index.php/zoociencias/article/view/24202. Acesso em: 15 de março de 2024.

TRINGALI, M. D. *et al.* Molecular phylogenetics and ecological diversification of the Transisthmian fish genus Centropomus (Perciformes: Centropomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 13, n. 1, p. 193-207, 1999. DOI: 10.1006/mpev.1999.0624

VARI, R. P**. Phylogenetic Relationships of the Families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces:Characiformes).** 1 ed. Washington: Smithsonian Contributions to Zoology, 1983.

VARI, R. P. The Curimatidae, a lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. *In:* **Neotropical Distribution Patterns: Proceedings of a Workshop.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciencias. 1988.

VARI, R. P. **Family curimatidae**. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** 1 ed. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

VINSON, C.C. *et al.* Sciaenidae fish of the Caeté River estuary, Northern Brazil: mitochondrial DNA suggests explosive radiation for the Western Atlantic assemblage. **Genetics and Molecular Biology,** v. 27, n. 2, p. 174-180, 2004. DOI: 10.1590/S1415-47572004000200008

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. **Journal Hered,** v. 92, n. 4, p. 371-373, 2001. DOI: 10.1093/jhered/92.4.371

ZHANG, R.; ZHU, T.; LUO, Q. The Complete Mitochondrial Genome of the Freshwater Fish Onychostoma ovale (Cypriniformes, Cyprinidae): Genome Characterization and Phylogenetic Analysis. **Genes** 14, 1227. 2023. DOI.10.3390/genes14061227

CAPÍTULO 8

FERRAMENTA DIGITAL NO ENSINO DE BIOLOGIA: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM MINICURSO DE CANVA

DIGITAL TOOL FOR TEACHING CYTOLOGY: EVALUATING THE EFFICACY OF A CANVA SHORT COURSE

Mário Jeová dos Santos

Mestrando em Biologia de fungos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil

Luana Lima Guimarães Alencar

Doutora em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brasil

DOI:10.52832/wed.130.783

Resumo: Percebendo o potencial das ferramentas digitais, novas formas de aprendizagem podem ser utilizadas em contexto didático, instrutivo e educativo; traduzindo essas tecnologias como veículo de ensino-aprendizagem. O presente artigo objetiva-se avaliar a eficácia e a satisfação dos participantes de um minicurso remoto sobre o uso do Canva como ferramenta didática no ensino de Biologia durante a pandemia de Covid-19. O minicurso foi oferecido via *Google Meet* e contou com a participação de 30 inscritos, dos quais 22 responderam ao questionário de avaliação. Os resultados indicam que 100% dos participantes consideraram os conteúdos e objetivos do minicurso adequados, com 63,6% atribuindo nota máxima (10) à atividade. A maioria dos participantes já conhecia o Canva, mas o minicurso ampliou seu entendimento sobre a aplicação pedagógica da ferramenta. Os dados sugerem que o minicurso foi bem-recebido e eficaz em promover o uso do Canva no contexto educacional, incentivando futuras iniciativas semelhantes.

Palavras-chave: Ensino Superior. Metodologia Ativa. Tecnologias Educacionais.

Abstract: Realizing the potential of digital tools, new forms of learning can be used in a didactic, instructive and educational context; translating these technologies as a teaching-learning vehicle. This article aims to evaluate the effectiveness and satisfaction of participants in a remote mini-course on the use of Canva as a teaching tool in teaching Biology during the Covid-19 pandemic. The mini-course was offered via Google Meet and was attended by 30 registrants, of which 22 responded to the evaluation questionnaire. The results indicate that 100% of participants considered the contents and objectives of the short course to be adequate, with 63.6% giving the activity a maximum score (10). Most participants already knew Canva, but the mini-course expanded their understanding of the tool's pedagogical application. The data suggests that the short course was well-received and effective in promoting the use of Canva in the educational context, encouraging future similar initiatives.

Keywords: University education. Active Methodology. Educational Technologies.

1 INTRODUÇÃO

As Tecnologias Digitais de Informação e Comunicação (TDIC) são ferramentas em constante evidência e vêm impactando significativamente nas maneiras como o ser humano concebe o mundo (Generoso, 2013; Vidal; Miguel, 2020). O professor tende de estar atualizado para usar e aplicar esses meios tecnológicos como ferramentas estimuladoras do conhecimento, utilizando de forma significativa e participativa por aprendizagens colaborativas (Rocha; Moraes, 2020). Interagir com ferramentas digitais é algo fundamental e transformador perante a inclusão tecnológica, entretanto, é muito comum ainda se deparar com o pouco uso dessas ferramentas ou mesmo, a falta de uso em contexto escolar (Souza Neto; Mendes, 2017).

Nesse sentido, a construção de novos conhecimentos, de novos materiais didáticos são propostas para compor o cotidiano escolar. Neste contexto, o Canva é um aplicativo e site de ferramentas digitais que contém vários recursos disponível para download em dispositivos IOS ou Android, com o intuito de desenvolver design autoral ou compartilhado, permitindo ao

usuário capturar, construir e partilhar suas ideias e criações visualmente, ilustrar a partir da leitura de textos e da estrutura de diversas interfaces, sendo uma delas o uso de mapa mental (Guimarães; Barin, 2020; Ferreira; Silva, 2020).

Em seu uso pode-se explorar fotografias, gráficos, fontes, ícones entre tantos outros meios. Além disso, o aplicativo Canva consegue auxiliar no desenvolvimento de infográficos contendo variados elementos visuais e textuais, contribuindo assim, com o estímulo à criatividade e tornando-se uma considerável ferramenta digital na construção de conteúdo (Rocha; Moraes, 2020). O aplicativo ainda permite a escrita colaborativa em tempo real de projetos, possibilitando que o autor principal vincule ao projeto vários colaboradores para discutir, comentar e alterar conjuntamente a proposta em construção.

Vale destacar que existem muitas estratégias que o professor pode pensar para a construção do ensino-aprendizagem. Bebel (2011), destaca algumas estratégias como: a aprendizagem baseada em problemas, o método de projetos, a pesquisa científica, participação do aluno no fato de aprender fazendo, e o estudo de caso. A partir dessas estratégias de ensino e aprendizagem, nota-se que todas são verdadeiras metodologias ativas onde o fator pedagógico transforma essas estratégias em verdadeiros métodos educativos (Moran, 2015).

Neste contexto, é essencial compreender que estratégias didáticas aplicadas no âmbito escolar, quando são interativas, criativas e colaborativas, remetem à metodologia ativa, a qual incorpora fatores dinâmicos que auxiliam no processo de ensino-aprendizagem (Rocha; Moraes, 2020). Dessa forma, a metodologia ativa, aliada à ferramenta digital Canva, reúne um conjunto de novas informações organizadas de maneira significativa, promovendo a interação dos discentes com a prática do ensino.

Entretanto, frente a situação de pandemia de Covid-19 que impôs o isolamento social para uma grande parte do mundo, todas as atividades precisaram ser adaptadas, incluindo as atividades do Programa institucional de Bolsas de iniciação à docência (PIBID) que precisaram enfrentar e superar grandes desafios. As adaptações e modificações tomaram como base o ensino remoto que surge como alternativa para minimizar os efeitos da pandemia, fazendo com que os minicursos da Semana Universitária (SU) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), que antes eram realizados de maneira presencial passassem a ser realizados no ambiente remoto por plataformas colaborativas.

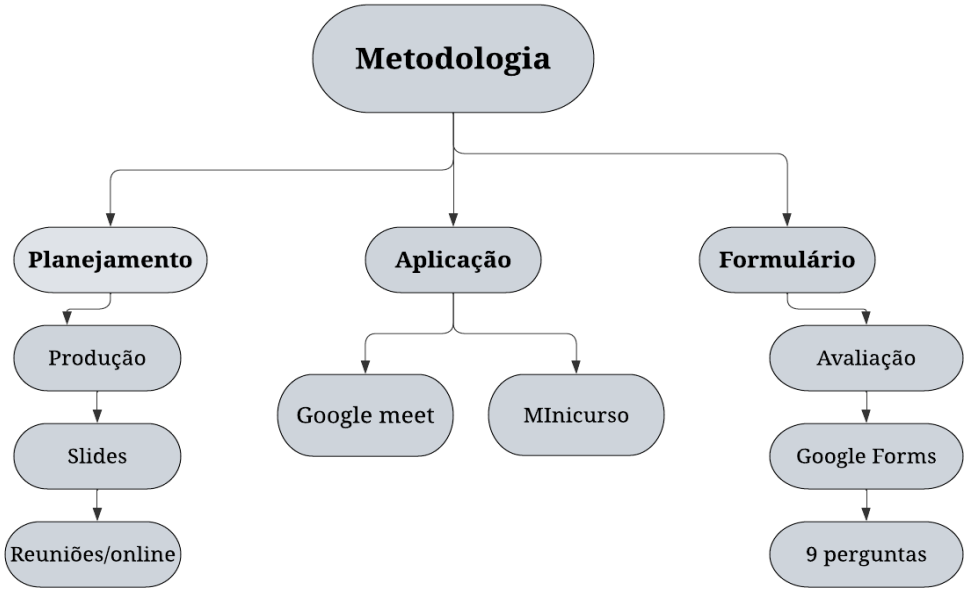
Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia e a satisfação dos participantes de um minicurso remoto sobre o uso do Canva como ferramenta didática no ensino de Biologia durante a pandemia de Covid-19.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo utilizou uma abordagem qualitativa e quantitativa para analisar um minicurso intitulado: "Utilização do Canva como ferramenta didática no ensino de biologia" realizado durante três dias (23, 24 e 25 de novembro de 2021) na Semana Universitária (SU) da Universidade Estadual do Ceará (UECE). A análise abrangeu o planejamento, a aplicação e a avaliação do minicurso. O desenvolvimento do minicurso foi estruturado em três fases, conforme apresentado no fluxograma (Figura 1). Na fase de planejamento, o minicurso precisou ser adaptado para um formato remoto devido à pandemia da Covid-19. Foram elaborados materiais com o conteúdo programático, roteiros para exposição e atividades práticas, além de premiações para os participantes que criassem as melhores artes para o Ensino de Biologia. Durante esta fase, também foi preparado um questionário para coletar informações sobre a percepção dos participantes quanto ao minicurso.

Figura 1 – Fluxograma do minicurso (planejamento, aplicação, formulário).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

O minicurso contou com um total de 30 participantes e foi conduzido na plataforma *Google Meet*, que permite interação síncrona entre ministrantes e participantes, incluindo comunicação por vídeo, áudio e chat, além de compartilhamento de tela. O minicurso ocorreu durante três noites, das 19h às 21h, totalizando 6 horas, e foi ministrado por três bolsistas do

PIBID. O conteúdo programático incluiu: 1) Introdução ao Canva; 2) História e criação da conta (celular e notebook); 3) Funções do Canva e 4) Utilização do Canva em atividades de ensino de Biologia. Para uma melhor compreensão dos tópicos abordados durante o minicurso, foram realizados momentos práticos que visavam aplicar os conteúdos ministrados, para fixar o que foi ensinado.

Após a conclusão do minicurso, um formulário com nove perguntas foi aplicado utilizando o *Google Forms,* entretanto somente 22 participantes responderam. As respostas foram analisadas e representadas em gráficos, tabelas e quadros para discussão dos resultados. Os participantes foram identificados por códigos alfanuméricos (P1, P2, P3 ... P22) para preservar sua identidade. Os resultados foram apresentados na forma de uma pesquisa de satisfação, indicando a percepção dos participantes sobre o minicurso.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira pergunta do formulário visou averiguar a composição dos participantes em termos de sua formação acadêmica. Observou-se que a maioria dos participantes era estudante de graduação, totalizando 95% (21 participantes) e somente um participante (5%) já havia concluído a graduação. Nota que especialistas, mestres(as), doutores(as) não tiveram informações (Tabela 1).

Tabela 1 – Nível de formação dos participantes do minicurso.

Formação	Participantes	Percentual
Graduando(a)	21	95%
Graduado (a)	1	5%
Especialista	-	-
Mestre(a)	-	-
Doutor(a)	-	-
Total	**22**	**100%**

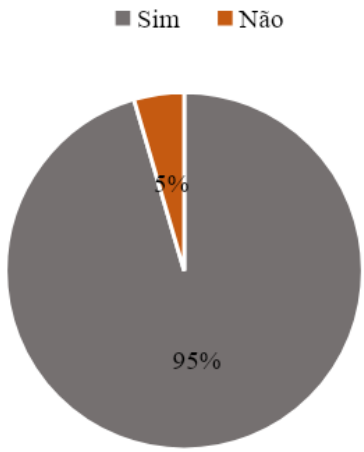
Fonte: Elaborado pelos autores, 2022.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Tendo em vista que o minicurso fazia parte de um evento universitário, é justificável que o maior número de participantes sejam graduandos. A predominância de graduandos entre os participantes do minicurso de Canva reflete o perfil de público encontrado no trabalho de Lima *et al.*, (2023) demonstrando um interesse significativo dos estudantes de graduação em adquirir competências digitais relevantes para suas áreas de estudo.

Em seguida, os participantes responderam se já tinham usado o Canva antes do minicurso. Foi observado que 95% (21 participantes) já haviam utilizado e somente 5% (1 participante) não havia utilizado (Figura 2).

Figura 2 – Resultados sobre a pergunta: Já tinha usado o Canva antes?



Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.

Durante o minicurso pode-se perceber que a maioria dos participantes já conhecia a ferramenta e mais da metade conheciam suas funcionalidades, porém não de modo aprofundado. A maioria utilizava a ferramenta para criar posts para redes sociais e não explorava nem usufruía dos demais recursos para o ensino. Apenas uma minoria utiliza todas as funcionalidades oferecidas pelo Canva para criar apresentações e slides, empregando a ferramenta de maneira mais criativa e eficaz para fins educacionais, o que sugere uma lacuna significativa no uso pedagógico do aplicativo.

Este fenômeno é similar ao observado no estudo de Caldas *et al.* (2021), onde a implementação do Google Classroom, apesar de bem recebida, também revelou a necessidade de maior aprofundamento e orientação sobre suas funcionalidades avançadas para maximizar seu uso pedagógico.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Essa constatação é similar ao relato de Lima *et al.* (2023), onde a introdução ao software Inventor expandiu as possibilidades dos participantes para além do uso básico, promovendo uma aplicação prática e relevante em suas áreas de estudo e trabalho. Ademais, os participantes demonstraram notória curiosidade em relação ao Canva, visto que muitas das suas utilidades poderiam ser empregues para construção do conhecimento e várias etapas da educação básica e superior.

Todos os participantes (100%) que responderam ao formulário consideraram-se satisfeitos com o minicurso ministrado de forma remota na plataforma *Google meet* como também consideraram o Canva uma boa ferramenta digital para o ensino. Essa satisfação também foi observada no estudo de Silva *et al.* (2022), onde a estratégia de facilitação e uso das breakout rooms no *Google Meet* foi bem recebida, apesar das limitações de tempo. A alta avaliação dos participantes em ambos os estudos sugerem que metodologias ativas e colaborativas, são eficazes em promover engajamento e satisfação. Além disso, a maioria dos participantes percebeu o Canva como uma ferramenta digital que não apenas promove a interação, mas também motiva os alunos a compreenderem os conteúdos de forma crítica. Esse aspecto do Canva contribui para um ensino mais participativo e colaborativo, incentivando os educandos a se envolverem ativamente no processo de aprendizado.

No que se refere à avaliação dos participantes quanto à abordagem do tema, a grande, 77,3% (17 participantes); avaliaram que o conteúdo foi abordado de forma organizada e esclarecedora, e 22,3% (5 participantes) avaliaram que os conteúdo e objetivo foram compreendidos, e nenhum participante considerou o conteúdo desorganizados, conforme observado na tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos participantes quanto ao conteúdo e objetivo do minicurso realizado.

Conteúdo e objetivo	**Participantes**	**Percentual**
Organizado e esclarecedor	17	77,3%
Compreendidos	5	22,7%
Não foram organizados	-	
Total	**22**	**100%**

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Através dos resultados obtidos por meio da tabela 2, pôde-se perceber a importância da organização dos objetivos e conteúdo do minicurso para melhor entendimento do assunto pelos participantes, visto que quando o conteúdo é bem direcionado causa uma maior motivação e interesse. Este feedback positivo reflete a eficácia do planejamento e da execução do minicurso, similarmente observado no estudo de Silva *et al.* (2022), onde a organização das atividades e a clareza das instruções foram aspectos cruciais para o sucesso da oficina.

Em relação ao nível de entendimento ao final do minicurso, observa-se na tabela 3, que a maioria dos participantes declarara um grau de conhecimento sobre o minicurso: excelente, (n=10; 45,5%) seguido de bom (n=8; 36,4%) e regular (n= 4; 18,2%). Portanto, o ponto de partida do minicurso contou com alunos já com algum grau de conhecimento sobre o Canva.

Tabela 3 – Nível de conhecimento dos participantes quanto ao minicurso realizado.

Conhecimento	Participantes	Percentual
Excelente	10	45,5%
Bom	8	36,4%
Regular	4	18,2%
Ruim	-	-
Não mudou	-	-
Total	**22**	**100%**

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

A partir da tabela 3 é possível verificar que o conhecimento dos participantes após o minicurso foi bastante satisfatório. Isso pode ser observado, pois o número de "Excelente" foi maior e, também, porque alguns participantes já tinham conhecimentos prévios sobre minicurso, fez com que os participantes interagissem ativamente com os monitores. Isso sugere que o minicurso foi eficaz em aumentar a compreensão e habilidades dos participantes na utilização do Canva como ferramenta educacional. No estudo de Caldas *et al.* (2021), os participantes também relataram um aumento no conhecimento e habilidades após o curso, especialmente no uso de metodologias ativas como o STEAM, que promove a interdisciplinaridade e a aprendizagem prática.

Quando indagados se depois do minicurso iriam utilizar o Canva, na prática da educação ou pessoal, 91% (20 participantes) responderam que usaria para educação e 9% (2 participantes) afirmaram que usaria como prática pessoal. A intenção de a maioria dos participantes de utilizar o Canva na prática educativa após o minicurso reflete o potencial transformador da ferramenta quando bem compreendida e aplicada. Caldas *et al.* (2021) também identificaram uma intenção positiva dos participantes de aplicar as metodologias e ferramentas aprendidas em suas práticas educacionais futuras, o que reforça a importância de cursos bem estruturados e aplicáveis.

Posteriormente, foi pedido aos participantes para definirem o minicurso em uma única palavra, como podemos observar no quadro 1:

Quadro 1 – Palavras dos participantes sobre o minicurso ministrado no ambiente remoto.

Defina o minicurso em uma palavra
P1 – "Maravilhoso"
P3 – "Excelente"
P4 – "Inspirador"
P9 – "Proveitoso"
P10- "Enriquecedor"
P12 – "Inovador"
P17 – "Criativo"

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

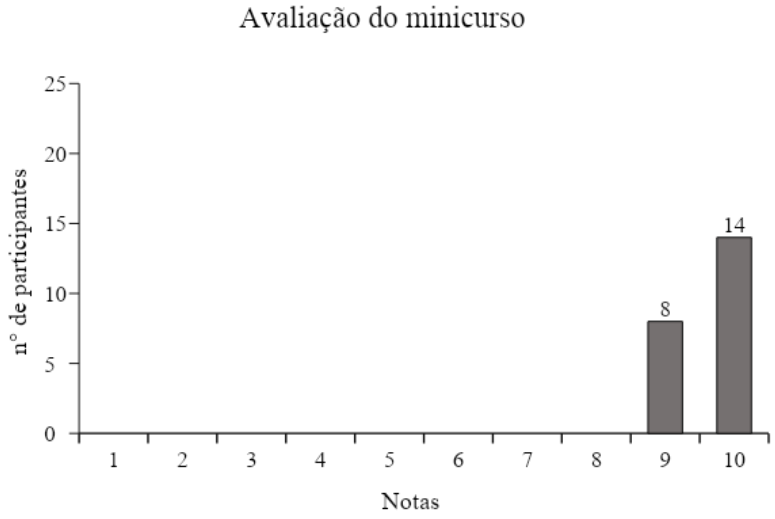
A partir das palavras apontadas no quadro 1 pôde-se inferir a contribuição positivas do minicurso, não somente para o conhecimento da ferramenta, mas também a sua contribuição para o desenvolvimento de habilidades dos participantes.

As descrições positivas dos participantes sobre o minicurso, utilizando palavras como "maravilhoso", "excelente" e "inovador", indicam um impacto motivador e inspirador. No artigo de Queiroz *et al.*, (2021), observa-se que os minicursos de Excel, Canva e Ftool também foram bem recebidos pelos participantes, que relataram altos níveis de satisfação e desenvolvimento de habilidades práticas.

Foi perguntado aos participantes, após o minicurso no formulário online: "Em uma escala de 0 a 10, o quanto este minicurso referente ao Canva qual sua satisfação?". As notas atribuídas pelos participantes ao minicurso mostram que 63,6% consideraram a atividade positiva

para aprofundamento sobre o assunto do Canva para o ensino, atribuíram a nota máxima (10). Por outro lado, 36,4% atribuíram nota (9) dos 22 participantes que responderam ao questionário online (Figura 3).

Figura 3 – Notas atribuídas pelos participantes ao minicurso realizado.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2024.

Baseado nos resultados obtidos, observou-se um alto nível de aprovação e percepções positivas quanto a eficácia do minicurso para o aprofundamento no uso do Canva para fins educacionais. Esses resultados são consistentes com as discussões apresentadas por Schneider *et al.* (2020), que enfatizam o potencial das Tecnologias Digitais da Informação e Comunicação (TDIC) para enriquecer o processo de ensino e aprendizagem. Além disso, o minicurso apresentou um grande potencial de contornar o distanciamento social, por ter sido realizado através do *Google Meet*, uma plataforma online que abrange um grande público.

4 CONCLUSÃO

O minicurso sobre o uso do Canva, realizado remotamente, demonstrou um alto grau de aceitação e satisfação entre os participantes. A familiaridade prévia com a ferramenta foi evidente, embora seu uso tenha sido inicialmente mais limitado às criações simples para redes sociais. Durante o minicurso, os participantes foram introduzidos as funcionalidades mais avançadas e pedagógicas do Canva, ampliando sua percepção sobre o potencial da ferramenta.

Os participantes consideraram o minicurso bem-organizado e esclarecedor. A satisfação geral foi elevada, refletindo a eficácia das metodologias utilizadas e a relevância do conteúdo

abordado. O feedback positivo, com descrições como "maravilhoso", "inovador" e "enriquecedor", indica um benefício tanto no desenvolvimento de habilidades quanto na aplicação prática do Canva na educação.

Além disso, os participantes expressaram a intenção de utilizar o Canva em suas práticas educativas futuras, ressaltando o potencial transformador da ferramenta quando compreendida e aplicada adequadamente. O minicurso não só aumentou o conhecimento dos participantes sobre o Canva, mas também inspirou uma abordagem mais criativa e eficaz no uso de tecnologias digitais na educação.

Portanto, o minicurso atingiu seus objetivos educacionais, promovendo interação e colaboração entre alunos e professores. A experiência reforça a importância de investir em tecnologias que facilitem o aprendizado e promovam um ensino mais participativo e envolvente.

REFERÊNCIAS

BERBEL, N. A. N. As metodologias ativas e a promoção da autonomia dos estudantes. **Semina: Ciências Sociais e Humanas**, v. 32, n. 1, p. 25-40, 2011.

CALDAS, R. L., MACHADO, C. B. H., & DOS REIS, M. A. M. A plataforma do google classroom como instrumento didático: um relato de experiência do ensino de ciências sob a perspectiva do método STEAM. **Expressa Extensão**, v. 26, n. 1, p. 659-674, 2021.

VIDAL, A. S.; MIGUEL, J. R. As Tecnologias Digitais na Educação Contemporânea /Digital Technologies in Contemporary Education. ID on line. **Revista de psicologia**, v. 14, n. 50, p. 366-379, maio 2020.

GENEROSO, A. A. P. *et al.* Abordagem Qualitativa do uso das TDIC na Educação Básica. In**: Anais do Workshop de Informática na Escola**. p. 230. 2013.

LIMA, G. M. B. *et al.* A extensão universitária como ferramenta de inclusão digital. **Expressa Extensão**, v. 28, n. especial, p. 13-21, 2023.

ROCHA, R. S. MORAES, B. L. C. de. Aplicação de ferramenta digital utilizando a Gallery walk: o uso do canva como estratégia didática no ensino técnico. **Anais do CIET:EnPED:2020 - (Congresso Internacional de Educação e Tecnologias | Encontro de Pesquisadores em Educação a Distância)**, São Carlos, ago. 2020.

FERREIRA, L. F. S.; SILVA, V. M. C. B. O uso do aplicativo Canva Educacional como recurso para avaliação da aprendizagem na Educação Online. **Research Society and Development** , v. 9, n. 8, e707986030, 2020.

GUIMARÃES, E. G.; BARIN, C. S. Canva e Quizlet: Ferramentas viáveis para o ensino de Inglês em tempos de Pandemia. **Redin - Práticas educacionais e inovação em tempo de isolamento social**, v. 9, n. 1, p. 152-174, 2020.

MORAN, J. M.; VALENTE, J. **A Educação a distância**. Summus Editorial, 2015.

QUEIROZ, A. B. R. *et al.* Análise do uso de tecnologias digitais na extensão universitária durante o isolamento social. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28614-28634, 2021.

SCHNEIDER, E. M. *et al.* O uso das tecnologias digitais da informação e comunicação (Tdic): possibilidades para o ensino (não) presencial durante a pandemia Covid-19. **Revista Científica Educ@ ção**, v. 4, n. 8, p. 1071-1090, 2020.

SILVA, A. S. R. *et al.* Estratégia de aprendizagem colaborativa com salas simultâneas no google meet. **Revista Brasileira de Educação em Ciência da Informação**, v. 9, n. especial, p. 1-15, 2022.

SOUZA NETO, A.; MENDES, G. M. L. Os Usos das Tecnologias Digitais na Escola: Discussões em torno da fluência digital e segurança docente. **Revista e-Curriculum**, v. 15, n. 2, p. 504-523, 2017.

TAROUCO, L. M. R.; *et al.* Formação de professores para produção e uso de objetos de aprendizagem. **Novas Tecnologias Educ**., v. 4, p. 1- 10, 2006.

Wissen Editora, 2025 |ISBN: 978-65-85923-28-6 |DOI: http://www.doi.org/10.52832/wed.130

Junielson Soares da Silva
Denise dos Santos Vila Verde
Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Isaquiel de Moura Ribeiro Azevedo
Organizadores

PESQUISAS EM CITOLOGIA, GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR: ASPECTOS GERAIS

Volume 2

Informações sobre a Editora
Wissen Editora
Homepage: www.editorawissen.com.br
Teresina – Piauí, Brasil
E-mails: contato@wisseneditora.com.br
wisseneditora@gmail.com

Siga nossas redes sociais:
@wisseneditora