

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Caracterização do gene *vasa* em *Rhamdia
quelen* para aplicações biotecnológicas**

Juliana Morena Bonita Ricci
Zootecnista

Jaboticabal, São Paulo
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Caracterização do gene *vasa* em *Rhamdia
quelen* para aplicações biotecnológicas**

Mestranda: Juliana Morena Bonita Ricci

Orientador: Dr. Rafael Henrique Nóbrega

Co-orientador: Dr. Emanuel R. M. Martinez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Jaboticabal, São Paulo
2015**

Ricci, Juliana Morena Bonita
R491c Caracterização do gene vasa em Rhamdia quelen para aplicações
 biotecnológicas / Juliana Morena Bonita Ricci. – – Jaboticabal, 2015
 iii, 70 p. : il. ; 28 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
 de Aquicultura, 2015

 Orientador: Rafael Henrique Nóbrega

 Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati. George Shigueki
 Yasui

 Bibliografia

 1. Gene vasa. 2. Células germinativas primordiais. 3. Aplicações
 biotecnológicas. I. Título. II. Jaboticabal- Centro de Aquicultura.

CDU 575:639.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Sumário

CAPÍTULO 1	7
REVISÃO DA LITERATURA	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. GENE VASA	8
1.2. CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS (PGCs)	9
1.3. VASA COMO MARCADOR MOLECULAR DAS CÉLULAS DA LINHAGEM GERMINATIVA	14
1.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	18
1.5. MODELO BIOLÓGICO: O JUNDIÁ (<i>RHAMDIS QUELEN</i>)	22
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	23
4. REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2	29
CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE ESPAÇO TEMPORAL DA EXPRESSÃO DO VASA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DE <i>RHAMDIS QUELEN</i>	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. ANIMAIS E AMOSTRAGEM	33
2.2. EXTRAÇÃO TOTAL DE RNA	34
2.3. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO	34
2.4. COMPARAÇÃO DE DOMÍNIOS PROTEICOS CONSERVADOS E ANÁLISE EVOLUTIVA	37
2.5. EXPRESSÃO DO VASA EM DIFERENTES TECIDOS POR RT-PCR E QRT-PCR	38
2.6. EXPRESSÃO DO VASA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL POR RT-PCR E QRT-PCR	39
2.7. HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> : CORTES HISTOLÓGICOS E EMBRIÕES INTEIROS	40
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3. RESULTADOS	41

3.1.	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO <i>RQVASA</i>	41
3.2.	A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	43
3.3.	COMPARAÇÃO DE DOMÍNIOS PROTEICOS DO <i>VASA</i> E ANÁLISE EVOLUTIVA.....	44
3.4.	EXPRESSÃO DO <i>RQVASA</i> EM DIFERENTES TECIDOS.....	47
3.5.	EXPRESSÃO DO <i>RQVASA</i> EM DIFERENTES ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS E LARVAL.	48
3.6.	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL	50
3.7.	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> GÔNADAS	52
4.	DISCUSSÃO	57
	REFERÊNCIAS.....	64
5.	CONCLUSÃO GERAL.....	70

Jai Guru Deva Om...

Nothing's gonna change my world

(Lennon – McCartney, 1969).

Agradecimentos

Ao meu querido Orientador Dr. Rafael Henrique Nóbrega pela oportunidade e por todos os conhecimentos transmitidos. Além disso, sou grata pela relação que tivemos, com você compartilhei momentos dos quais nunca esquecerei e sempre recordarei com carinho e muitas risadas, muito obrigada!

Ao meu Co-orientador Dr. Emanuel Ricardo Monteiro Martinez, pela paciência, ensinamentos, conselhos, momentos compartilhados, amizade e carinho. Muito obrigada meu amigo.

Ao professor Dr. Sérgio Ricardo Batlouni pela indicação aos professores Dra. Irani Quaggio-Grassiotto e ao Dr. Rafael Henrique Nóbrega.

Ao professor Dr. Robie Allan Bombardelli por toda disposição e colaborações realizadas neste projeto juntamente ao Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA).

Aos professores Dr. Rüdiger W. Schulz e Dr. Jan Bogerd da Universidade de Utrecht – Holanda, pela colaboração e internacionalização deste projeto.

À banca, composta pela Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, Prof. Dr. George Shigueki Yasui, Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega e ao Dr. Emanuel Ricardo Monteiro Martinez pela disponibilidade de avaliar a presente dissertação.

Aos meus amigos do laboratório, Andrés, Lucas, Marcos, Aldo, Gabi e Melanie, obrigada por todo o carinho.

A Sheryll, pela força, amizade e lealdade que demonstrou durante todos os momentos que compartilhamos.

Ao Arno, pelo companheirismo, disponibilidade, atenção e sorrisos compartilhados diariamente, obrigada amigo.

Aos professores, Dr. Claudio de Oliveira, Dr. Claudio Angelo Agostinho, Dr. Fausto Foresti, Dr. Cesar Martins, Dr. Danilo Moretti-Ferreira, Dr. Ivan de Godoy Maia, e as professoras Dra. Irani Quaggio-Grassiotto e Dra. Maeli Dal Pai, pela assistência técnica e estrutural.

Aos técnicos, José Eduardo pela disposição em ajudar sempre e a Keila Emílio por todas nossas conversas e conselhos doados.

Aos secretários David, Veralice e Luciana, por toda a atenção dispensada.

Ao Gabriel (Pink) e Fábio (Escova), pela amizade e conhecimentos transmitidos.

À república Curva de Rio e todas as moradoras que por ali passaram em especial a Caroline (Klypso), minha “filha”. Obrigada por todos os dias que dividi com você.

A minha família, Solange (Belinha), Edison (pai), Eduardo (Du) e Marcela (Lé) pelo apoio e compreensão em todas as escolhas realizadas em minha vida, todos fazem parte do meu ser e para sempre estaremos juntos, vocês são a verdadeira concretização do amor além da vida.

Ao Marques Tagima Marques, por todo companheirismo, amor e compreensão.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) e ao Grupo de Biologia Molecular e Reprodução.

Deixo aqui minha profunda gratidão e respeito a cada *Rhamdia quelen* utilizado nesse estudo.

A todos muito obrigada!

Apoio Financeiro

A CAPES, pela bolsa de Mestrado concedida;
A FUNDUNESP (Processo/ Edital Nº 447/2014 05/2014);
Ao CNPq (Proc. 482946/2012 – 1; 3 – 2012/ 150068);
A FAPESP (Proc. 2012/00423 – 6; 2013/227778 – 3).

RESUMO

O gene *vasa* codifica uma proteína que pertence a uma família de proteínas denominada DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box, constituída de RNA helicases ATP-dependente. Extremamente conservada entre os organismos, sua função está associada com o metabolismo do RNA. Na maioria das espécies investigadas, a expressão do *vasa* restringe-se a linhagem germinativa. Estudos realizados utilizando metodologias distintas (knockdown, knockout, mutação) para conhecer o papel do *vasa*, demonstraram que o *vasa* tem fundamental importância no desenvolvimento da linhagem germinativa dos invertebrados e vertebrados. Em nosso estudo, caracterizamos o cDNA do *vasa* de forma inédita em uma espécie nativa, *R. quelen* (Heptapteridae, Siluriformes). Análises comparativas da proteína foram realizadas, mostrando que a proteína é altamente conservada ao longo da evolução. Além disso, a expressão do *Rqvasa* (*Rhamdia quelen vasa*) por RT-PCR (transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase) e qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real) em diferentes tecidos mostra que o mesmo é expresso somente nas gônadas. Os sítios de expressão do *Rqvasa* localizam-se exclusivamente nas células da linhagem germinativa. Análises por RT-PCR e por qRT-PCR durante o desenvolvimento embrionário de *R. quelen* demonstram que o *Rqvasa* é herdado maternalmente e sua expressão diminui gradativamente ao longo do desenvolvimento embrionário e larval. Através da hibridização *in situ* nos embriões e larvas, foi possível visualizar o processo migratório das células germinativas primordiais (CGPs). Desta forma, este trabalho caracteriza de forma inédita, o cDNA do *Rqvasa*, descrevendo sua expressão durante o desenvolvimento assim como o processo migratório das CGPs. Os resultados obtidos neste estudo servirão de base para utilizar o gene *vasa* em diferentes abordagens biotecnológicas, como por exemplo, esterilidade, transgenia (*vasa::egfp*, como exemplo), transplante utilizando células germinativas, dentre outras.

Palavras chave: DEAD box, CGPs, helicase, linhagem germinativa.

ABSTRACT

The *vasa* gene encodes a protein that belongs to protein family called DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box, which is constituted of ATP-dependent RNA helicases. This protein is extremely conserved among the organisms, and its role is associated with RNA metabolism. In the majority of the investigated species, *vasa* expression is restricted to the germline cells. Different methods (such as knockdown, knockout and mutation) to address *vasa*'s role have demonstrated that *vasa* is crucial for germ cell development. In this study, we have characterized the full cDNA of *vasa* from a native species, *R. quelen* (Heptapteridae Siluriformes). Comparative analysis using the protein sequence has demonstrated that Vasa is highly conserved along the evolution. Moreover, we have evaluated through RT-PCR and qRT-PCR *Rqvasa* expression in different tissues, showing that *vasa* transcripts are exclusively expressed in the *R. quelen* gonads, specifically in the germinal cells RT-PCR and qRT-PCR analysis during embryonic and larval development have shown that *Rqvasa* is maternally inherited and its expression decreased during development. *in situ* hybridization techniques performed in whole embryos and larvae allowed to study the primordial germ cells (PGCs) migratory process towards the gonadal ridge. This work has characterized for the first time the full length cDNA of *vasa*, describing its expression patterns during *R. quelen* embryonic development as well as the PGCs migratory process in this species. Our results will contribute for the basic reproductive biology of this native species, and will support studies using *vasa* in different biotechnological studies, such as sterility, transgenesis (*vasa::egfp*, for example) germ cell transplantation and others.

Key-words: DEAD box, CGPs, helicase, germ line

Capítulo 1

Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gene vasa

O gene *vasa* codifica uma série de proteínas que pertencem à família DEAD-box (LINDER *et al.*, 1989). Esta família é composta por RNA helicases ATP-dependente, cuja função está associada com o metabolismo do RNA (TANNER *et al.*, 2003). Com estrutura altamente conservada entre os organismos, esta família é caracterizada por conter sequências específicas de aminoácidos que se repetem entre seus membros, os motivos protéicos (Figura 1) (LINDER *et al.*, 1989). Ao todo são encontrados nove motivos, incluindo o motivo DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), o qual designa o nome da família DEAD-box (Figura 1) (ROCAK & LINDER, 2004).

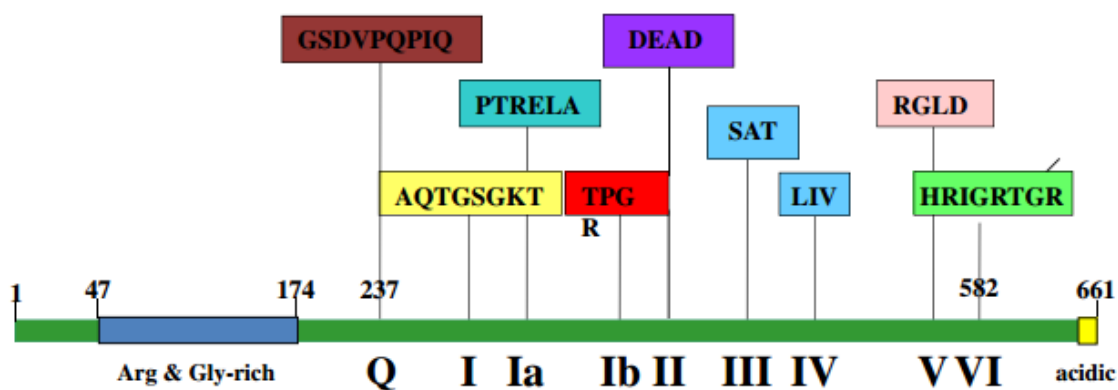


Figura 1 - Diagrama esquemático da proteína *vasa* de *Drosophila*, mostrando os motivos (Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V e VI) conservados. Em roxo, o motivo DEAD que designa o nome do conjunto de proteínas da família DEAD box. A região N terminal (esquerda, azul) é rica em arginina e glicina, e a C terminal tem caráter ácido (direita, amarelo). Retirado de Lasko (2013).

De modo geral, as helicases são enzimas que catalisam a separação dos ácidos nucleicos de fita dupla, de forma dependente de energia (ALBERTS *et al.*, 2010). Embora atuem como helicases, estas proteínas também possuem outros papéis em diversos processos celulares (CORDIN *et al.*, 2006). Por exemplo, durante a formação e maturação do RNA, podem ser observadas interações complexas e dinâmicas da molécula de RNA inicial (transcrito primário) com outros ácidos nucleicos e proteínas até a maturação final do RNA, nas quais estas proteínas podem atuar (ROCAK & LINDER, 2004). Tais interações vão desde os processos de *splicing* do pré-RNA mensageiro até a biogênese do ribossomo, onde rearranjos do complexo ribonucleoproteico e a

participação das RNAs helicases são necessários para obtenção do produto final, conforme ilustra a Figura 2 abaixo (ROCAK & LINDER, 2004).

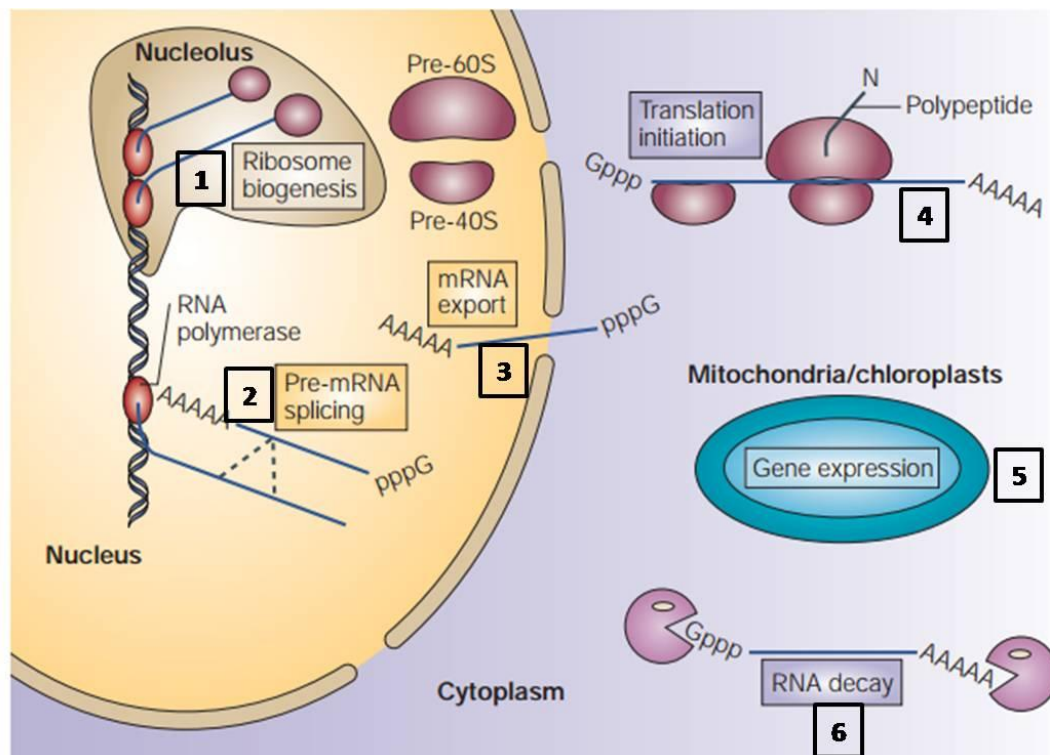


Figura 2 - Processos celulares que requerem RNA helicases, DEAD-box. Experimentos bioquímicos e genéticos em *Saccharomyces cerevisiae*, bem como em outros organismos, têm indicado várias funções celulares para as proteínas DEAD-box. Estas incluem: 1) biogênese do ribossomo (por exemplo, Fal1, também conhecido como eIF4AIII), Rok1, Spb4 e Dbp10), 2) *slipping* do pré-RNA (Prp28, Prp5 e Sub2), 3) exportação de RNA (Dbp5 e Sub2), 4) iniciação da tradução (eIF4A, Ded1 e vasa), 5) expressão de genes de mitocôndrias/cloroplastos (Mss116, Mrh4 e Cit-19) e 6) degradação do RNA (RhIB, Dbp2 e Dhh1). Retirado de Rocak & Linder (2004).

Algumas proteínas DEAD-box podem funcionar em dois ou mais processos, como por exemplo, a Sub2 que participa no processo de *slipping* e exportação do RNA. Isto indica que as helicases servem como *links* ou elementos de controle para diversos processos celulares (ROCAK & LINDER, 2004).

1.2. Células germinativas primordiais (PGCs)

As células germinativas primordiais (PGCs) são células diplóides, e precursoras das células da linhagem germinativa masculina e feminina (RAZ, 2003). A linhagem germinativa é passível de manter a totipotência (células tronco), como de sofrer ciclos de proliferação, diferenciação, e meiose, em contraste com as células somáticas que são destinadas a ter um número fixo e terminalmente diferenciadas (BRAAT *et al.*, 1999). O termo "células germinativas" é utilizado para descrever as células que pertencem à linhagem

germinativa em todas as fases da vida do animal, e seu desenvolvimento pode ser dividido com base no seu comportamento e estágio de diferenciação (NIEUWKOOP & SUTASURYA, 1979).

Durante o desenvolvimento embrionário, antes de serem morfológicamente distinguíveis e segregadas da linhagem somática, as células da linhagem germinativa são muitas vezes referidas como células germinativas primordiais presumíveis (PPGCs) (NIEUWKOOP & SUTASURYA, 1979). Uma vez 'separadas' do soma, as PGCs apresentam características típicas que incluem morfologia nuclear, material elétron-denso, perfis específicos de expressão gênica e intensa atividade migratória, uma vez que migram pelo mesentério até o primórdio gonadal, onde colonizarão a futura gônada do embrião (GILBERT, 2003).

Uma vez que ocorre a diferenciação sexual, as PGCs diferenciam-se nas células tronco da linhagem germinativa masculina ou feminina, as quais darão origem aos espermatozoides e oócitos respectivamente, nos indivíduos adultos (RAZ, 2003). Durante o desenvolvimento embrionário, dois padrões de especificação das PGCs podem ser observados entre os animais, como ilustra a Figura 3 abaixo (NAKAMURA & SEYDOUX, 2008).

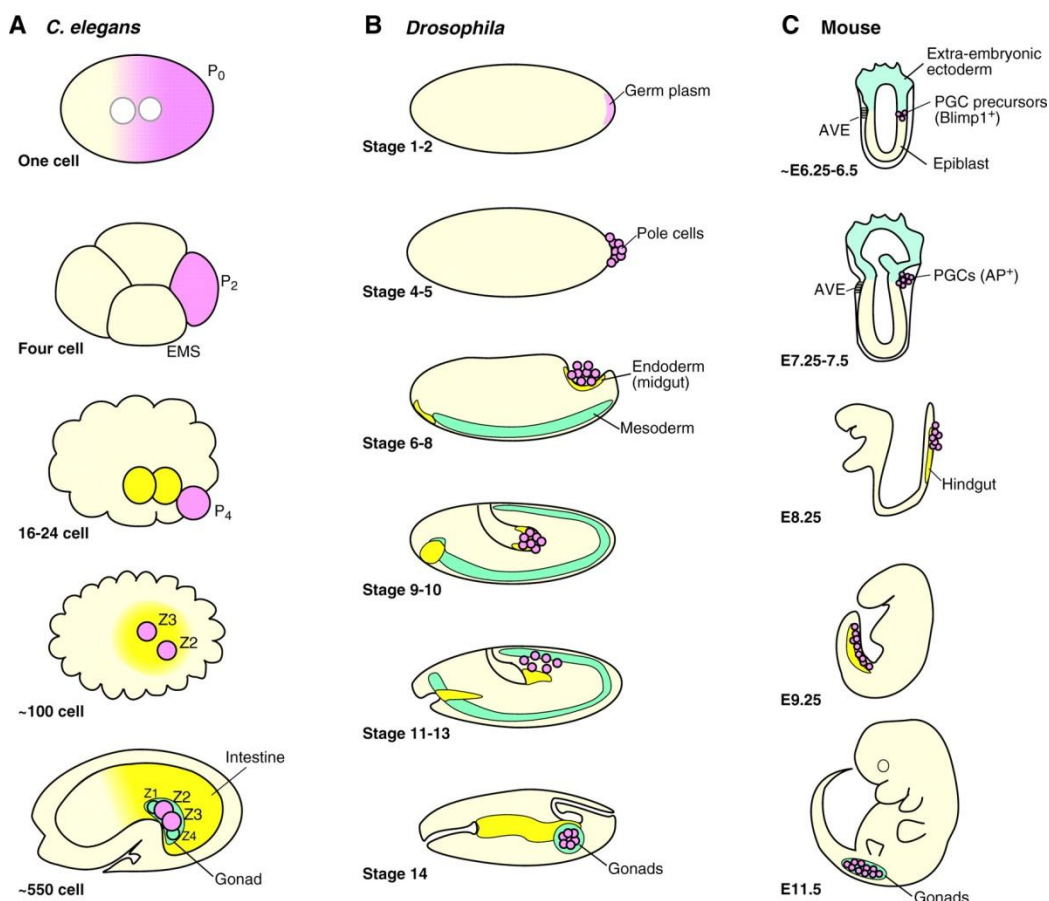


Figura 3 - Especificação das PGCs: dois padrões distintos podem ser observados entre os animais. Em *Caenorhabditis elegans*, **(A)** o plasma germinativo (em rosa) localiza-se assimetricamente no zigoto e segrega-se em blastômeros específicos que darão origem às PGCs que migram para o interior do embrião. Em *Drosophila* **(B)**, o plasma germinativo (em rosa) localiza-se na região posterior do zigoto e segrega-se especificamente originando PGCs que também migram para o interior do embrião, semelhantemente a *C. elegans*. Em camundongos **(C)**, sinais extra-embriários ativam a expressão do gene *Blimp1* (em rosa) em células do epiblasto que darão origem às PGCs as quais migram pelo mesentério até o primórdio gonadal em formação. Retirado de Nakamura & Seydoux (2008).

Em vários organismos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (Figura 3) e *Xenopus laevis*, determinantes citoplasmáticos, conhecidos como plasma germinativo, localizam-se assimetricamente no zigoto (ver rosa na Figura 3). Nas divisões celulares subsequentes, o plasma germinativo segrega-se do "soma", dando origem às PGCs (Figura 3A, B). O plasma germinativo constitui-se de uma série de RNAs de longa duração associados às proteínas herdadas maternalmente (NAKAMURA & SEYDOUX, 2008; SAFFMAN & LASKO, 1999; WILLIAMSON & LEHMANN, 1996). Este processo também é observado em peixes teleósteos, como em medaka (*Oryzias latipes*) (HERPIN *et al.*, 2007) e zebrafish (*Danio rerio*) (HASHIMOTO *et al.*, 2004).

Em mamíferos, conforme mostrado na Figura 3C, não existe plasma germinativo no início do período do desenvolvimento embrionário (NAKAMURA & SEYDOUX, 2008). Neste segundo padrão, a especificação das PGCs se dá pela interação célula-célula, antes do período da gastrulação do animal (TAM & ZHOU, 1996). A Figura 3C mostra ainda que sinais extra-embriônicos ativam a expressão do gene *Blimp1* em células do epiblasto, as quais darão origem às PGCs em camundongos (NAKAMURA & SEYDOUX, 2008). Em ratos este processo é mediado pela proteína morfogenética óssea (BMP) (YING *et al.*, 2001).

Os determinantes citoplasmáticos ou plasma germinativo estão presentes continuamente ao longo do desenvolvimento da linhagem germinativa, com a exceção do espermatozoado maduro (VORONINA *et al.*, 2011). Morfologicamente, o plasma germinativo refere-se a corpos elétron-densos próximos ao envoltório nuclear, ou dispersos no citoplasma em associação com mitocôndrias das células germinativas (Figura 4).

Tais estruturas receberam diferentes nomes ao longo dos anos, tais como grânulos “P” em *C. elegans* (STROME & WOOD, 1982), grânulos polares em *D. melanogaster* e outros insetos (COUNCE, 1963), e grânulos germinativos em *X. laevis* (ALMUKHTA.KA & WEBB, 1971). Apesar das distintas nomenclaturas, a composição do plasma germinativo é semelhante nos mais diversos organismos, sendo constituído por mitocôndrias, grânulos elétron-densos com complexos de RNAs/proteínas (Figura 4).

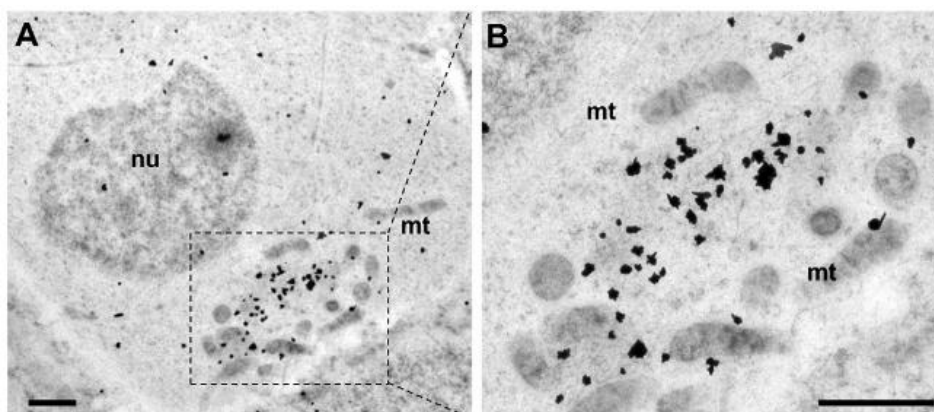


Figura 4 - Imunodeteção do plasma germinativo com nanopartículas de ouro em microscopia eletrônica de transmissão. Cortes ultrafinos de testículo de medaka (*Oryzias latipes*) adulto incubado com anticorpo anti-Vasa. (A) Espermatogônia. A área selecionada indica o plasma germinativo próximo ao envoltório nuclear, (nu) núcleo, (mt) mitocôndria. (B) Plasma germinativo em maior aumento, constituído de mitocôndrias e imunomicroscopia eletrônica com nanopartículas de ouro positiva para proteína germinativa Vasa. Escala: 1 µm. Retirado de Yuan *et al.*, 2014.

Tal estrutura mostra-se dinâmica ao longo desenvolvimento das células germinativas, estando em maior quantidade em células germinativas mais indiferenciadas e diminuindo gradativamente ao longo da gametogênese (RAZ, 2003).

Após sua especificação, as PGCs vão migrar para a região do primórdio gonadal (ou crista gonadal), futura gônada do indivíduo (WEIDINGER *et al.*, 1999). Nos peixes teleósteos, as PGCs aparecem translocadas a partir do epiblasto para o hipoblasto durante a gastrulação (Figura 5A, B, C). Na somitogênese, as PGCs encontram-se associadas à camada sincicial do vitelo mais periférica (Figura 5D,E), onde irão migrar pelo mensentério até colonizar o primórdio das gônadas juntamente com as células mesenquimais precursoras das células somáticas (Figura 5F,G) (BRAAT *et al.*, 1999).

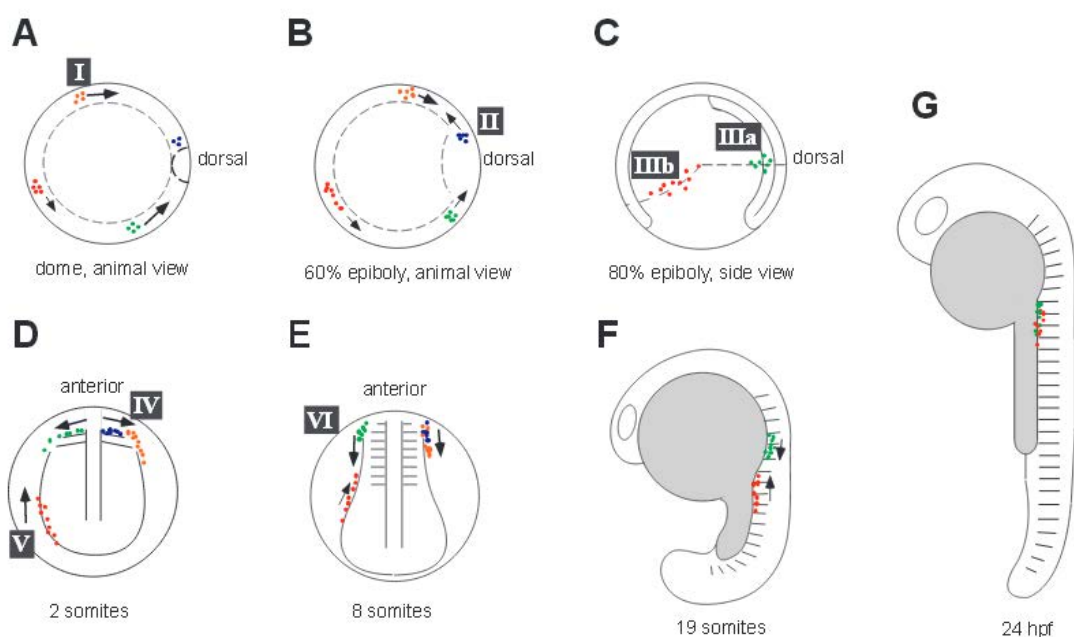


Figura 5 - Padrão de migração das PGCs em zebrafish. (A;I) Grupos de PGCs estão localizados marginalmente no epiblasto. (B;II) Com a epibolia, as PGCs migram para a linha dorsal, e posteriormente localizam-se ventralmente. (C- IIIa;IIIb) PGCs translocam-se do epiblasto para o hipoblasto a medida que o epiblasto dobra-se nele mesmo e avança internamente no embrião. (D, E) Somitogênese; PGCs localizam-se entre mesoderme e saco vitelínico. PGCs de cada lado do embrião convergem e migram pelo mesentério colonizando a futura região da gônada no embrião. Retirado de Raz (2003).

1.3. *vasa* como marcador molecular das células da linhagem germinativa

As primeiras descrições morfológicas das PGCs nos peixes teleósteos datam da década de 50 (JOHNSTON, 1951). Nestes estudos iniciais, a origem embrionária das PGCs, assim como sua proliferação e migração foi investigada com apenas ferramentas morfológicas (BRUSLE, 1983; HAMAGUCHI, 1982; JOHNSTON, 1951; TIMMERMANS & TAVERNE, 1989; VANDENHURK & SLOF, 1981). Nos anos seguintes, a identificação de genes específicos que caracterizam as PGCs permitiu uma melhor compreensão do desenvolvimento da linhagem germinativa neste grupo de animais (HAY et al., 1988). Neste contexto, a tabela abaixo (RAZ, 2003) mostra uma série de genes específicos da linhagem germinativa, investigados até o presente momento: *vasa*, *nanos-1*, *dazl*, *dead end*, *cxcr4b* e o *sdf-1a* (RAZ, 2003).

Tabela 1 Genes expressos em células germinativas primordiais (PGCs) de zebrafish e seus ortólogos em diferentes animais. Modificado de Raz (2003).

Gene	<i>Danio rerio</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Mus domesticus</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>vasa</i> DEAD-box RNA helicase	<i>vasa</i>	<i>vasa</i>	<i>glh-1,-2,-3 e-4</i>	<i>VLG1</i>	<i>Mvh</i>	<i>VASA</i>
<i>nanos-1</i>	<i>nanos-1</i>	<i>nanos</i>	<i>nanos-1 e -2</i>	<i>cat-2</i>	-	<i>NOS1</i>
<i>dazl</i>	<i>dazl</i>	<i>boule</i>	<i>daz-1</i>	<i>dazl</i>	<i>Dazl e Boule</i>	<i>DAZ, DAZL e BOULE</i>
<i>dead end</i>	<i>dead end</i>	-	-	<i>dead end</i>	<i>dead end</i>	-
<i>cxcr4b</i>	<i>cxcr4b</i>	-	-	<i>cxcr4b</i>	-	-
<i>sdf-1a</i>	<i>sdf-1a</i>			<i>sdf-1a</i>	<i>Sdf-1a</i>	<i>SDF-1</i>

Dentre os genes apresentados acima, o *vasa* é um dos mais estudados, em função de sua sequência ser altamente conservada, e também por ser

expresso em células germinativas tanto na fase embrionária como na fase adulta (XU *et al.*, 2005).

Identificado pela primeira vez em *D. melanogaster*, o gene *vasa* é expresso na região posterior do ovo, em estruturas conhecidas como grânulos polares (plasma germinativo) (HAY *et al.*, 1988). O homólogo do gene *vasa* também foi encontrado no plasma germinativo de outros organismos, como em rãs (*Xenopus laevis*) (KOMIYA *et al.*, 1994), camundongo (FUJIWARA *et al.*, 1994) e nematódeo (*C. elegans*) (GRUIDL *et al.*, 1996).

Com base na sequência de *D. melanogaster*, Yoon e colaboradores (1997) clonaram o gene *vasa* em zebrafish (*D. rerio*), obtendo desta forma o primeiro marcador molecular específico para as PGCs e células germinativas para esta espécie. Além disso, também foi possível avaliar os sítios de expressão do *vasa* durante o desenvolvimento embrionário de zebrafish, conforme ilustrado pelo esquema abaixo (Figura 6).

No estágio de duas a quatro células (Figura 6), os transcritos do *vasa* (pontos escuro) ocorrem no plano de clivagem de duas a quatro células, e posteriormente são segregados nas PGCs (YOON *et al.*, 1997). A presença do *vasa* nos estágio iniciais do desenvolvimento (1 a 2 células, Figura 6) indicam que o RNAm do gene é herdado maternalmente (YOON *et al.*, 1997). Esta herança materna também pode ser comprovada pela técnica de *northern blot* (técnica de análise da expressão gênica através da detecção do RNA em membrana de nitrocelulose) após a fertilização (YOON *et al.*, 1997).

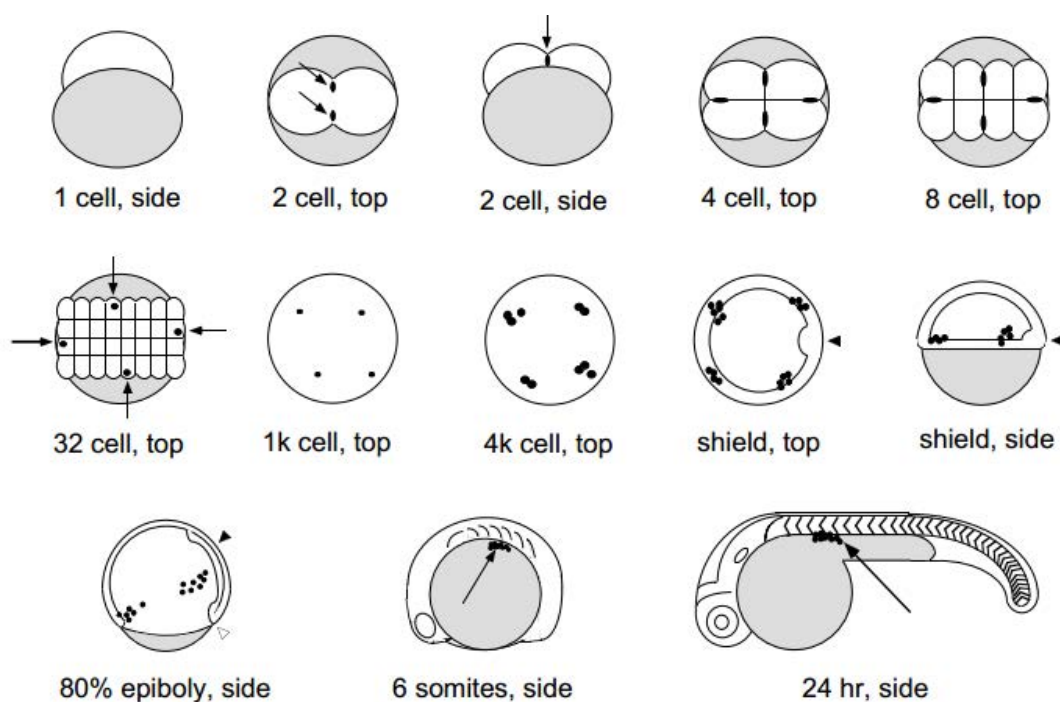


Figura 6 - Identificação dos sítios de expressão do gene *vasa* durante a embriogênese de zebrafish. A etapa do desenvolvimento embrionário e a região do embrião que foi representada (top ou side) está indicada abaixo de cada desenho. O vitelo está sombreado e as setas apontam para as células que expressam o *vasa*. O RNA do *vasa* é detectado ao longo das duas primeiras clivagens, e em seguida se condensa em quatro aglomerados que irão formar as PGCs. Retirado de Yoon e colaboradores (1997).

Em zebrafish, a herança materna do *vasa* é estável até os 10 primeiros dias do desenvolvimento (HARTUNG *et al.*, 2014). Tal observação foi obtida a partir de linhagens deficientes para o gene *vasa*. Em tais linhagens, a expressão do *vasa* observada até os 10 primeiros dias só pode ser resultado da herança materna do mesmo (HARTUNG *et al.*, 2014).

Além de sua caracterização, o papel do gene *vasa* durante o desenvolvimento gonadal tem sido alvo de muitas pesquisas. Por exemplo, estudos com *D. melanogaster* demonstraram que fêmeas que tiveram mutações em alelos que contêm genes maternalmente herdados, dentre eles o *vasa*, não conseguem completar a oogênese, sendo, portanto, estéreis (SCHUPBACH & WIESCHAUS, 1991). Por outro lado, camundongos deficientes para o gene homólogo do *vasa* (*Mvh*) gera esterilidade apenas para os indivíduos do sexo masculino (TANAKA *et al.*, 2000). Em peixes, estudos em medaka (*Oryzias latipes*) mostram que o *knockdown* do gene *vasa*, resulta na migração ectópica das PGCs (LI *et al.*, 2009). Em zebrafish, a perda da

função do gene *vasa* causa esterilidade em machos que possuem testículos formados apenas por células de Sertoli (Figura 7C, C', C").

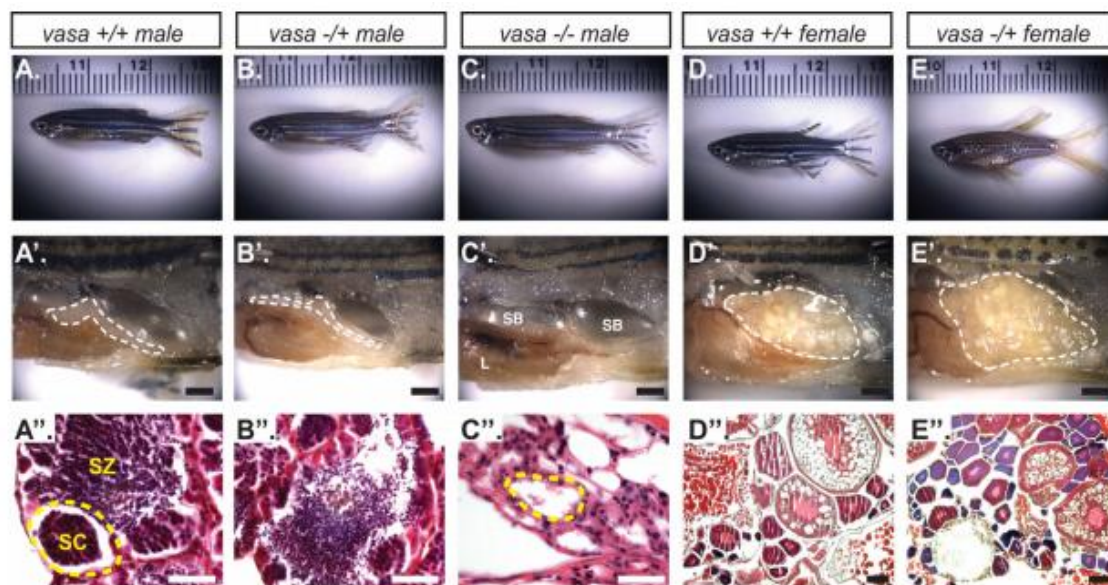


Figura 7 - Fenótipos dos animais selvagens com *vasa* nos dois alelos (+/+) (A,D), heterozigotos mutantes do *vasa* (-/+) (B,E) e homozigotos (-/-). (A'B'C'D'E') Visão lateral da dissecação das gônadas (pontilhadas em branco). A espermatogênese é normal tanto em peixe selvagem (A'') como no heterozigoto *vasa* (B''). Oogênese normal em peixe selvagem (D'') e heterozigoto (E''). Em machos (C'') que perderam o *vasa* em seus dois alelos (-/-) são estéreis e possuem testículos compostos por túbulos vazios, sem células germinativas. Cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina. Escala, 0,1 cm (A'-E'); 10 μm (A''-E''). Modificado de Hartung et al.,(2014).

O papel do *vasa* na regulação do desenvolvimento gonadal ainda é incipiente, visto que ele está presente durante toda a linhagem germinativa, exceto em espermatozoides (Figura 8). Além disso, como mostra a Figura 8 abaixo, o *vasa* é mais expresso em células germinativas iniciais, como em espermatogônias e oogônias, e sua expressão diminui gradativamente com a progressão da espermatogênese/oogênese (YUAN *et al.*, 2014).

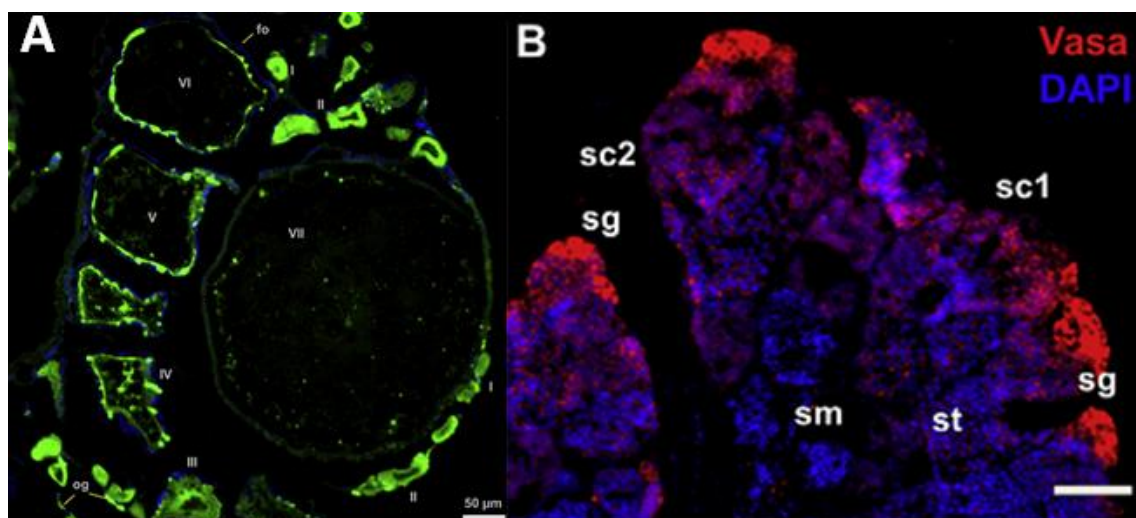


Figura 8 - Expressão da proteína Vasa em gônadas de medakas (*O. latipes*) adulto. (A) Diferentes estágios da oogênese; em verde expressão do Vasa e azul (DAPI) os núcleos; (og) oôgnia, (I-VII) fases dos oócitos e (fo) células foliculares. (B) Testículo; em vermelho expressão do Vasa e azul (DAPI) os núcleos; (sg) espermatogônia, (sc1) espermatócito primário, (sc2) espermatócito secundário, (st) espermatídes e (st) espermatozoide. Escala: (A) 50µm (B) 100µm. Retirado de Yaun e colaboradores (2014).

1.4. Aplicações biotecnológicas

Várias são as aplicações biotecnológicas que utilizam o gene *vasa* como marcador específico da linhagem germinativa (PGCs/células germinativas). Uma delas é a criação de linhagens transgênicas que expressam ou são deficientes para o gene *vasa*. Através do uso de um gene repórter, por exemplo, o gene da proteína verde fluorescente (GFP), é possível criar um organismo transgênico, no qual a sequência codificante para GFP permanece sob o controle transcricional do promotor pertencente ao gene de interesse. Desta forma, o padrão de expressão do gene no organismo torna-se visível pela fluorescência verde quando exposta sob microscópio/estereomicroscópio de fluorescência (ALBERTS *et al.*, 2010). Neste sentido, linhagens transgênicas de peixes que expressam o *gfp* sob controle do promotor do *vasa* podem ser geradas para visualizar as PGCs. A Figura 9 mostra animais transgênicos *vasa::egfp* (*egfp*, enhanced green fluorescent protein sob controle do *vasa*), em que torna-se possível a visualização das PGCs (verde) em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário de zebrafish (KROVEL & OLSEN, 2002).



Figura 9 - Zebrafish *vasa::egfp*. A expressão do *vasa* durante os diferentes estágios do desenvolvimento embrionário através de microscopia de fluorescência. Setas indicam a expressão do *vasa::egfp* nas PGCs. (A) 24 horas pós-fertilização; (B) 5 dias pós-fertilização (dpf); e (C) 13 dpf. Retirado de Krovel & Olsen (2002).

Essa linhagem transgênica (*vasa::egfp*) pode ser útil para várias aplicações no campo da biotecnologia e da aquicultura. Por exemplo, através de técnicas de separação (FACS, fluorescent activated cell sorting), é possível isolar estas células com base em sua fluorescência. Não somente as PGCs podem ser isoladas, mas também as espermatogônias tronco, já que a expressão do *vasa* é maior nessas células em comparação com os outros tipos de células germinativas (Figura 10) (NÓBREGA *et al.*, 2010).

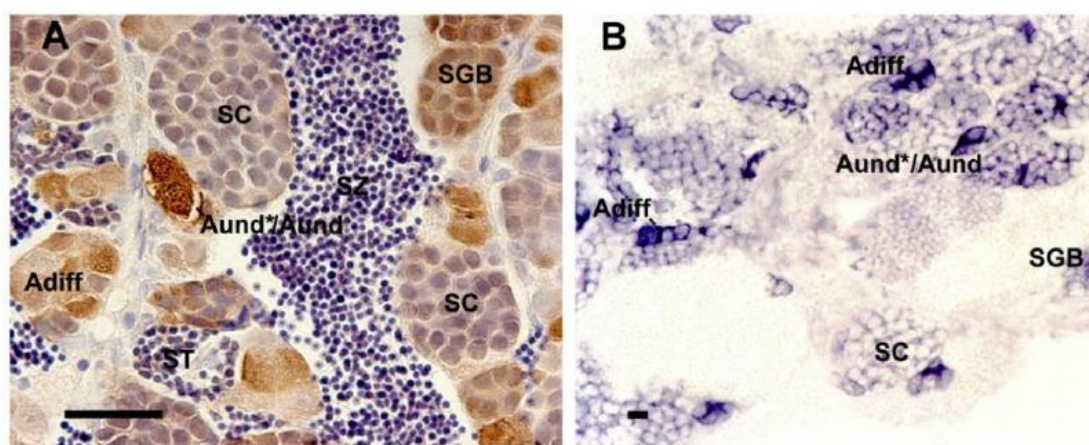


Figura 10 - Expressão do Vasa durante a espermatogênese de zebrafish. (A) Imunodeteção do gfp em testículos *vasa::egfp*. (B) Imunodeteção do Vasa em criocortes. Observa-se uma maior expressão do gene *vasa* em espermatogônias indiferenciadas Aund * / Aund. Espermatogônias diferenciadas (Adiff), espermatogônias tipo B (SGB), espermatócitos (SC), espermatídes (ST), espermatozoides (SZ). Escala = 25 µm (A) e 10 µm (B). Retirado de Nóbrega e colaboradores (2010).

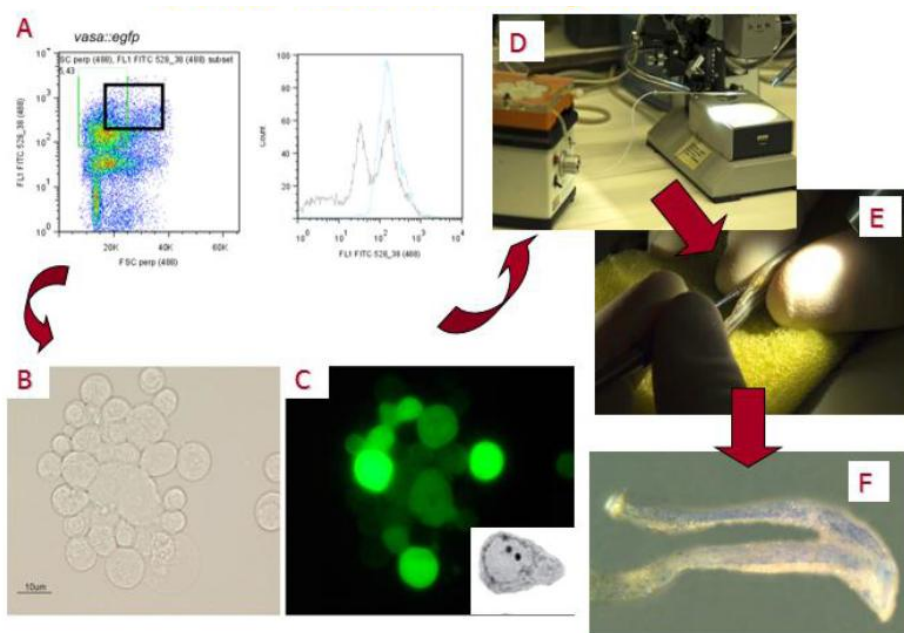


Figura 11 - Seleção das espermatogônias *vasa::egfp*. (A) Separação das células por FACS (fluorescent activated cell sorting). (B,C) Espermatogônias selecionadas, em campo claro (B) e sob microscópio de fluorescência (C). (D, E, F) Procedimentos de transplante de espermatogônias tronco através da papila urogenital de zebrafish. Retirado de Nóbrega e colaboradores (2010).

Uma vez isoladas, as PGCs ou as espermatogônias tronco podem ser utilizadas em estudos de transplante (Figura 11) (BRINSTER & AVARBOCK, 1994; YOSHIZAKI *et al.*, 2012). Tais estudos mostram que PGCs/espermatogônias tronco de trutas arco-íris são capazes de se diferenciar em gametas com características genéticas da truta nos salmões adultos (OKUTSU *et al.*, 2006 a, b; YOSHIZAKI *et al.*, 2012). Além disso, é possível encontrar larvas de trutas a partir do cruzamento destes salmões (Figura 12), demonstrando que o transplante xenogênico de espermatogônias pode ser usado para produzir indivíduos de uma espécie utilizando outra espécie correlata. Desta forma, o transplante de espermatogônias tronco ou PGCs pode ser utilizado para preservar espécies em extinção ou até mesmo ser aplicado em espécies que possuem problemas ou limitações reprodutivas (YOSHIZAKI *et al.*, 2012).

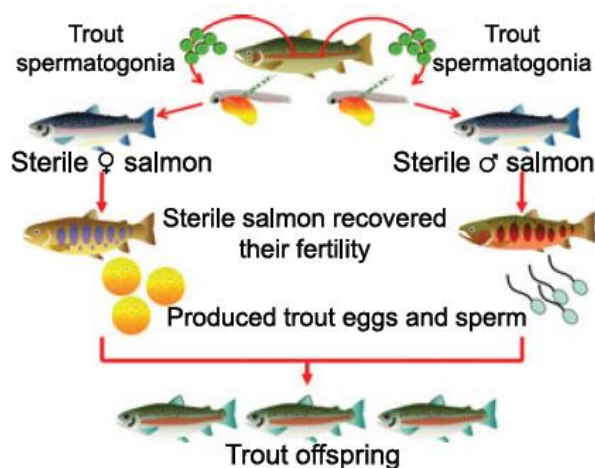


Figura 12 - Transplante xenogênico de espermatogônias de truta em larvas de salmão. Retirado de Yoshizaki e colaboradores (2012).

Outra possibilidade é o transplante das espermatogônias *vasa::egfp* em animais adultos que tiveram sua espermatogênese depletada anteriormente (LACERDA *et al.*, 2010; NÓBREGA *et al.*, 2010). Neste caso, as espermatogônias transplantadas colonizam o testículo do receptor e originam gametas com características genéticas da espécie doadora (LACERDA *et al.*, 2012; NÓBREGA *et al.*, 2010). Tais estudos criam um novo cenário no campo da biotecnologia para preservar espécies ameaçadas em extinção, conservar o genótipo de espécies de interesse zootécnico, resolver problemas reprodutivos e até mesmo gerar transgênicos se as espermatogônias transplantadas tiverem seu material genético alterado (LACERDA *et al.*, 2012; YOSHIZAKI *et al.*, 2012).

Além disso, os modelos biológicos que expressam *vasa::egfp* poderiam aumentar significativamente as pesquisas referentes aos mecanismos que afetam direta ou indiretamente o desenvolvimento gonadal, visto que é possível visualizar em tempo real as células germinativas e seu comportamento microscópico (FILBY *et al.*, 2014).

Outra aplicação seria a produção de animais mutantes *knockout* para o gene *vasa*. Como mencionado, animais que perdem este gene tornam-se estéreis, e, portanto, não conseguem se reproduzir. Atualmente na aquicultura,

existe uma crescente preocupação com o escape de espécies de cultivo exótica ou endêmica. Tal escape pode causar um desequilíbrio ambiental, e muitas vezes a extinção de outras espécies. A produção de animais knockout para o gene *vasa*, por exemplo, torna-se uma alternativa, pois se escaparem estas espécies não poderão se reproduzir, uma vez que são estéreis. O *knockout* do gene *vasa* não é só importante para questões ecológicas, mas também em termos de produção. Uma vez estéril toda a energia seria deslocada para o crescimento somático ao invés de produzir gametas.

Desta forma, as aplicações biotecnológicas que envolvem o gene *vasa* como marcador de PGCs e de células germinativas são bastante promissoras no campo da aquicultura, no entanto, a caracterização do gene *vasa* para muitas espécies de produção (incluindo aqui espécies nativas) ainda é totalmente desconhecida.

1.5. Modelo biológico: o Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O Jundiá (*R. quelen*) (Heptapteridae, Siluriformes) (Figura 13) é uma espécie de ampla distribuição geográfica desde a região central da Argentina até o sul do México (SILFVERGRIP, 1996). Esta espécie tem atraído atenção de piscicultores da região Sul do Brasil devido a uma série de vantagens como resistência ao manejo, docilidade, crescimento acelerado principalmente no inverno, boa eficiência alimentar, e carne saborosa sem espinhos intramusculares (MEYER & FRACALOSSI, 2005). Por estas razões, o Jundiá tem um enorme potencial dentro do cenário da aquicultura brasileira, sendo, portanto, um excelente modelo para investigar aspectos básicos e aplicados relacionados à sua fisiologia, reprodução, manejo, dentre outros.



Figura 13 - *Rhamdia quelen*. Retirado: <http://aqua-fisher.narod.ru/Vid/SILUROID/HEPTAPTERID.html>

2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se o gene *vasa* como marcador de PGCs/células germinativas, assim como suas promissoras aplicações biotecnológicas, torna-se importante caracterizar o cDNA do *vasa* em espécies de importância econômica, incluindo espécies nativas. Até o presente momento, o *vasa* não foi caracterizado em nenhuma das espécies nativas brasileiras. Além disso, considerando as características favoráveis do Jundiá (*R. quelen*) e seu enorme potencial dentro da aquicultura brasileira, esta espécie foi adotada como modelo biológico neste estudo. Para isso, torna-se importante compreender os aspectos básicos do *vasa* no Jundiá antes de utilizá-lo como modelo em aplicações biotecnológicas, tais como transplante de células germinativas, e produção de transgênicos, ou *knockouts*.

3. OBJETIVOS

Geral

- ✓ Caracterizar e analisar a expressão do *vasa* durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen*.

Objetivos Específicos

- ✓ Clonar o cDNA completo do *vasa* de *R. quelen*;
- ✓ Avaliar a expressão gênica do *vasa* por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa) e qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real - quantitativo), durante o desenvolvimento embrionário/larval e também em diferentes tecidos/órgãos no indivíduos adultos (macho/fêmea);
- ✓ Identificar os sítios de expressão dos transcritos primários do *vasa* através da técnica de hibridização *in situ* ao longo do desenvolvimento embrionário e larval e também nas gônadas dos indivíduos adultos de *R. quelen*.

4 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science Publishing. p. 2010.
- ALMUKHTA.KA e WEBB, A. C. Ultrastructural study of primordial germ cells, oogonia and early oocytes in *Xenopus laevis*. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 26, p. 195-217, out. 1971
- BRAAT, A. K.; SPEKSNIJDER, J. E. e ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. **International Journal of Developmental Biology**, v. 43, n. 7, p. 745-760, 1999
- BRINSTER, R. L. e AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11303-11307, nov. 1994.
- BRUSLE, S. CONTRIBUTION TO the sexuality of a hermaphroditic teleost, *Serranus hepatus* L. **Journal of Fish Biology**, v. 22, n. 3, p. 283-292, 1983.
- CORDIN, O.; BANROQUES, J.; TANNER, N. K.; LINDER, P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene**, v. 367, p. 17-37, fev.2006.
- COUNCE, S. J. Developmental morphology of polar granules in drosophila - including observations on pole cell behavior and distribution during embryogenesis. **Journal of Morphology**, v. 112, n. 2, p. 129-145, mar. 1963
- FILBY, A. L.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M. e TYLER, C. R. The *vas::egfp* transgenic zebrafish: A practical model for studies on the molecular mechanisms by which environmental estrogens affect gonadal sex differentiation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 602-605, mar. 2014.
- FUJIWARA, Y.; KOMIYA, T.; KAWABATA, H.; SATO, M.; FUJIMOTO, H.; FURUSAWA, M.; NOCE, T. Isolation of a dead-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila*- vasa and its specific expression in germ-cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 25, p. 12258-12262, dez. 1994.
- GILBERT, S. F. *Developmental biology*. 5a. ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 1997.
- GRUIDL, M. E.; SMITH, P. A.; KUZNICKI, K. A.; MCCRONE, J. S.; KIRCHNER, J.; ROUSSELL, D. L.; STROME, S.; BENNETT, K. L. Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of**

- Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13837-13842, nov. 1996.
- HAMAGUCHI, S. A light-microscopic and electron-microscopic study on the migration of primordial germ-cells in the teleost, *Oryzias latipes*. **Cell and Tissue Research**, v. 227, n. 1, p. 139-151, 1982
- HARTUNG, O.; FORBES, M. M.; MARLOW, F.; Zebrafish Vasa is required for germ-cell differentiation and maintenance. **Molecular Reproduction & Development**, v. 81, p. 946–961. 2014.
- HASHIMOTO, Y.; MAEGAWA, S.; NAGAI, T.; YAMAHA, E.; SUZUKI, H.; YASUDA, K.; INOUE, K. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. **Developmental Biology**, v. 268, n. 1, p. 152-161, abr. 2004.
- HAY, B.; JAN, L. Y. e JAN, Y. N. A protein-component of drosophila polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to Atp-dependent helicases. **Cell**, v. 55, n. 4, p. 577-587, nov.1988.
- HERPIN, A.; ROHR, S.; RIEDEL, D.; KLUEVER, N.; RAZ, E.; SCHARTL, M. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). **BMC Developmental Biology**, v. 7, n. 3, p. 1-10, 11 jan. 2007.
- JOHNSTON, P. M. The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides* (lacepede). **Journal of Morphology**, v. 88, n. 3, p. 471-542, 1951.
- KOMIYA, T.; ITOH, K.; IKENISHI, K.; FURUSAWA, M. Isolation and characterization of a novel gene of the dead box protein family which is specifically expressed in germ-cells of *Xenopus laevis*. **Developmental Biology**, v. 162, n. 2, p. 354-363, abr. 1994.
- KROVEL, A. V. e OLSEN, L. C. Expression of a *vas::egfp* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. **Mechanisms of Development**, v. 116, n. 1-2, p. 141-150, ago. 2002.
- LACERDA, S. M. S. N.; APONTE, P. M.; COSTA, G. M. J.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; SEGATELLI, T. M.; SILVA, M. A.; FRANCA, L. R. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 798-808, out-dez. 2012.
- LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; COSTA, G. M. J.; SEGATELLI, T. M.; QUIRINO, B. R.; QUEIROZ, B. M.; KALAPOTHAKIS, E.; FRANCA, L. R. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. **Plos One**, v. 5, n. 5, maio. 2010.

- LINDER, P.; LASKO, P. F.; ASHBURNER, M.; LEROY, P.; NIELSEN, P. J.; NISHI, K.; SCHNIER, J.; SLONIMSKI, P. P. Birth of the d-e-a-d box. **Nature**, v. 337, n. 6203, p. 121-122, jan. 1989.
- MEYER, G. e FRACALOSSO, D. M. Estimation of jundiá (*Rhamdia quelen*) dietary amino acid requirements based on muscle amino acid composition. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 4, p. 401-405, jul-ago 2005.
- NAKAMURA, A. e SEYDOUX, G. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. **Development**, v. 135, n. 23, p. 3817-3827, dez. 2008.
- NIEUWKOOP, P. D. e SUTASURYA, L. A. Primordial germ cells in the Chordates. **Developmental and Cell Biology Series**, v. 7, p. i-xi, 1-187, 1979.
- NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; DE FRANCA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. **Plos One**, v. 5, n. 9, set. 2010.
- OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2725-2729, fev. 2006.
- OKUTSU, T.; YANO, A.; NAGASAWA, K.; SHIKINA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 6, p. 685-693, dez. 2006.
- RAZ, E. Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 9, p. 690-700, set. 2003.
- ROCAK, S. e LINDER, P. Dead-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 3, p. 232-241, mar. 2004.
- SAFFMAN, E. E. e LASKO, P. Germline development in vertebrates and invertebrates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 8-9, p. 1141-1163, jul. 1999.
- SCHUPBACH, T. e WIESCHAUS, E. Female sterile mutations on the 2nd chromosome of *Drosophila melanogaster*. 2. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. **Genetics**, v. 129, n. 4, p. 1119-1136, dez. 1991.

- SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996.
- STROME, S. e WOOD, W. B. Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 79, n. 5, p. 1558-1562, 1982.
- TAM, P. P. L. e ZHOU, S. X. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. **Developmental Biology**, v. 178, n. 1, p. 124-132, ago. 1996.
- TANAKA, S. S.; TOYOOKA, Y.; AKASU, R.; KATOH-FUKUI, Y.; NAKAHARA, Y.; SUZUKI, R.; YOKOYAMA, M.; NOCE, T. The mouse homolog of *Drosophila vasa* is required for the development of male germ cells. **Genes & Development**, v. 14, n. 7, p. 841-853, abr. 2000.
- TANNER, N. K.; CORDIN, O.; BANROQUES, J.; DOERE, M.; LINDER, P. The Q motif: A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. **Molecular Cell**, v. 11, n. 1, p. 127-138, jan. 2003.
- THISSE, C.; THISSE, B. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. **Nat. Protocols**, v. 3, n. 1, p. 59-69, 2008.
- TIMMERMANS, L. P. M. e TAVERNE, N. Segregation of primordial germ-cells - their numbers and fate during early development of *Barbus conchoni* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by thymidine-h-3 incorporation. **Journal of Morphology**, v. 202, n. 2, p. 225-237, nov. 1989.
- VANDENHURK, R. e SLOF, G. A. A morphological and experimental-study of gonadal sex-differentiation in the rainbow-trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, v. 218, n. 3, p. 487-497, 1981.
- VORONINA, E.; SEYDOUX, G.; SASSONE-CORSI, P.; NAGAMORI, I. RNA Granules in Germ Cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, dez. 2011.
- WEIDINGER, G.; WOLKE, U.; KOPRUNNER, M.; KLINGER, M.; RAZ, E. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. **Development**, v. 126, n. 23, p. 5295-5307, dez. 1999.
- WILLIAMSON, A. e LEHMANN, R. Germ cell development in *Drosophila*. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 365-391, 1996.

- XU, H. Y.; GUI, J. F. e HONG, Y. H. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 3, p. 872-882, jul. 2005.
- YING, Y.; QI, X. X. e ZHAO, G. Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 14, p. 7858-7862, jul. 2001.
- YOON, C.; KAWAKAMI, K. e HOPKINS, N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development**, v. 124, n. 16, p. 3157-3165, ago. 1997.
- YOSHIZAKI, G.; OKUTSU, T.; MORITA, T.; TERASAWA, M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y. Biological Characteristics of Fish Germ Cells and their Application to Developmental Biotechnology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 187-192, ago. 2012.
- YUAN, Y.; LI, M. e HONG, Y. Light and electron microscopic analyses of Vasa expression in adult germ cells of the fish medaka. **Gene**, v. 545, n. 1, p. 15-22, jul. 2014.
- .

Capítulo 2

Caracterização e análise espaço - temporal da expressão do *vasa* durante o desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia quelen*

1. INTRODUÇÃO

Os transcritos primários do gene *vasa* foram originalmente descobertos nos grânulos polares da região posterior dos ovos de *Drosophila melanogaster* (HAY *et al.*, 1988). Tais grânulos são formados por complexos de RNAs/proteínas que se associam às mitocôndrias no zigoto e das células germinativas de diversos organismos (VORONINA *et al.*, 2011), formando o que é conhecido como plasma germinativo (RAZ, 2003). Por conter determinantes citoplasmáticos, o plasma germinativo é responsável pela especificação das células germinativas primordiais (CGPs) no início do desenvolvimento embrionário (NAKAMURA & SEYDOUX, 2008). Após sofrer o processo de especificação, as CGPs migram para a região do primórdio gonadal (ou crista gonadal), onde se associam à células somáticas da gônada e sofrem ciclos de proliferação e diferenciação para formar a futura gônada do indivíduo (WEIDINGER *et al.*, 1999). Dentre os genes responsáveis pela especificação das CPGs em diversos organismos, o *vasa* é um dos mais estudados, em função de sua sequência ser altamente conservada, e também por ser expresso nas células germinativas tanto na fase embrionária como na fase adulta (XU *et al.*, 2005).

Os transcritos primários do *vasa* codificam a proteína RNA helicase ATP-dependente, que pertence a uma família de proteínas denominadas DEAD-box. Esta família é caracterizada pela presença de nove domínios, altamente conservados entre seus membros, incluindo o domínio DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), o qual designa o nome da família DEAD-box (ROCK & LINDER, 2004). Essas regiões conservadas estão envolvidas em vários processos celulares, dentre eles o metabolismo do RNA (ROCK & LINDER, 2004).

Desde a sua descoberta em *D. melanogaster*, o homólogo do *vasa* foi descrito em diversos organismos, dentre eles invertebrados e vertebrados (RAZ, 2003; SAFFMAN & LASKO, 1999).

Recentes estudos têm caracterizado o gene *vasa* em diversas espécies de teleósteos, bem como investigado o padrão de expressão do gene durante o desenvolvimento embrionário e larval como reportado em *Danio rerio* (YOON *et al.*, 1997), *Dicentrarchus labrax* (BLASQUEZ *et al.*, 2011), *Gadus morhua* L. (PRESSLAUER *et al.*, 2012); *Salmo salar* (NAGASAWA *et al.*, 2013) e também na

vida adulta, como em *Carassius auratus gibelio* (XU *et al.*, 2005), *Clarias gariepinus* (RAGHUVÉER *et al.*, 2010), *Apostichopus japonicus* (YAN *et al.*, 2013), *Lates calcarifer* (XU *et al.*, 2014), na tentativa de entender o papel do *vasa* durante a gametogênese. Neste sentido, estudos mostram que o *vasa* parece ser crucial para o desenvolvimento da linhagem germinativa em algumas espécies, por exemplo, em *D. melanogaster*, fêmeas com mutações em diversos alelos, incluindo o *vasa*, não conseguiram completar a oogênese sendo, portanto, estéreis (SCHUPBACH & WIESCHAUS, 1991). Por outro lado, camundongos deficientes para o gene homólogo do *vasa* (*Mvh*) são estéreis apenas para os indivíduos do sexo masculino (TANAKA *et al.*, 2000). Em peixes, estudos com medaka (*Oryzias latipes*) mostraram que o knockdown do gene *vasa*, resulta na migração ectópica das CGPs (LI *et al.*, 2009). Em zebrafish, a perda da função do gene *vasa* também resultou em esterilidade nos machos (HARTUNG *et al.*, 2014).

Como marcador específico da linhagem germinativa, o *vasa* também é utilizado em diversas aplicações biotecnológicas. Uma delas é a criação de linhagens transgênicas (*vasa::egfp*) que expressam o gene da proteína verde fluorescente (GFP) sob o controle do promotor do *vasa*, tornando possível a visualização das células germinativas e sua rastreabilidade no microscópio (FILBY *et al.*, 2014). Alguns modelos biológicos transgênicos (*vasa::egfp*) já foram produzidos em *Oncorhynchus mykiss* (YOSHIZAKI *et al.*, 2000), *O. latipes* (TANAKA *et al.*, 2001) e *D. rerio* (KROVEL & OLSEN, 2002). Essa técnica além de possibilitar estudos *in vivo*, tem outra aplicabilidade que seria o isolamento das células que expressam o *vasa* com base em sua fluorescência. Não somente as CGPs podem ser isoladas, mas também as espermatogônias tronco, já que a expressão do *vasa* é maior nessas células em comparação com outros tipos de células germinativas (NÓBREGA, *et al.*, 2010).

Uma vez isoladas, as CGPs ou as espermatogônias tronco podem ser utilizadas em estudos de transplante (BRINSTER & AVARBOCK, 1994; YOSHIZAKI *et al.*, 2012). Tais estudos mostram que CGPs/espermatogônias do doador transplantadas na cavidade celomática de larvas recém-eclodidas (TAKEUCHI *et al.*, 2003; TAKEUCHI *et al.*, 2004) ou em indivíduos adultos que tiveram sua espermatogênese depletada (LACERDA *et al.*, 2010; NÓBREGA *et al.*, 2010), são capazes de colonizar a gônada do receptor e assim gerar gametas

com características genéticas da espécie doadora (OKUTSU *et al.*, 2006a; OKUTSU *et al.*, 2006b; YOSHIZAKI *et al.*, 2012). Tais estudos criam um novo cenário no campo da biotecnologia para preservar espécies ameaçadas em extinção, conservar o genótipo de espécies de interesse zootécnico, resolver problemas reprodutivos e até mesmo gerar transgênicos se as espermatogônias transplantadas tiverem seu material genético alterado (LACERDA *et al.*, 2012, YOSHIZAKI *et al.*, 2012). Desta forma, as aplicações biotecnológicas que envolvem o gene *vasa* como marcador de células germinativas são bastante promissoras no campo da aquicultura. No entanto, a caracterização do cDNA de *vasa* para muitas espécies de produção (incluindo aqui espécies nativas) ainda é totalmente desconhecida.

O Jundiá, *R. quelen* (Rq) (Heptapteridae, Siluriformes) é uma espécie de ampla distribuição geográfica desde a região central da Argentina até o sul do México (SILFVERGRIP, 1996). Esta espécie produzida na região Sul do Brasil, possui alto potencial econômico dentro do cenário da aquicultura brasileira, devido a uma série de vantagens como resistência ao manejo, docilidade, crescimento acelerado principalmente no inverno, boa eficiência alimentar, e carne saborosa sem espinhos intramusculares (MEYER & FRACALLOSSI, 2005). Considerando as características favoráveis do Jundiá (*R. quelen*) e seu enorme potencial dentro da aquicultura brasileira, esta espécie foi adotada como modelo biológico para estudos biotecnológicos da reprodução. Para isso, torna-se importante compreender os aspectos básicos do *vasa* nesta espécie. Desta forma, neste estudo, de forma inédita, o cDNA do Rq *vasa* foi clonado e sua expressão gênica caracterizada por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa) e qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real - quantitativo), em diferentes tecidos/órgãos do indivíduo adulto (macho/fêmea), assim como durante o desenvolvimento embrionário/larval. Além disso, os sítios de expressão de *Rqvasa* foram identificados por hibridização *in situ* durante o estágio embrionário, bem como nas gônadas dos indivíduos adultos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e amostragem

Este projeto (protocolo 666-CEUA) está de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), e foi aprovado "*Ad referendum*" pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu em 14 de outubro de 2014.

Todos os exemplares de *R. quelen* utilizados neste trabalho foram provenientes do Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), Toledo – Paraná, Brasil. Os reprodutores selecionados (machos e fêmeas) foram induzidos artificialmente e os ovos obtidos foram distribuídos em incubadoras verticais (200 L) do tipo funil com fluxo ascendente de água volume útil de 160 L, a uma temperatura de 22° C.

Para análise da expressão do *vasa* durante o desenvolvimento embrionário e larval, foram coletadas amostras com diferentes horas pós-fertilização (hpf): 0 hpf (estágio com única célula), 4 hpf, 7 hpf, 10 hpf (90% epibolia), 13 hpf (fechamento do blastóporo e anel germinativo), 16 19, 22, 25 hpf (formação dos somitos), 31 e 37 hpf (eclosão), 43 e 49 hpf (pigmentação dos olhos e abertura da boca). A partir deste momento, o intervalo de coleta foi de 24 horas, contanto dias pós-fertilização (dpf): 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 dpf. Todas as amostras foram constituídas de um "pool" de aproximadamente 100mg de embriões/larvas.

Indivíduos adultos de ambos os sexos machos (n=3) e fêmeas (n=3) foram sacrificados com uma dose letal de benzocaína (>250 mg/ L) e dissecados para coleta de diferentes tecidos/órgãos (cérebro, brânquias, coração, fígado, músculo, intestino, rim, testículos e ovários).

Todas as amostras (embriões/larvas/tecidos) foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente em a – 80 °C, até o momento de seu processamento.

2.2. Extração total de RNA

A extração do RNA total de embriões, larvas e tecidos/orgãos de *R. quelen* foram realizadas de acordo com o método do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as normas do fabricante. A quantidade do RNA total foi avaliada por espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare). Para evitar contaminação genômica, as amostras foram tratadas com o DNase I kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) antes da síntese de cDNA de acordo com métodos usuais (Nóbrega et al., 2010). A síntese de cDNA foi realizada em seguida com random hexamers e o uso de Superscript II, de acordo com especificações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

2.3. Clonagem e Sequenciamento

Os primers (Tabelas 1 e 2) para clonagem do cDNA do *vasa* em *R. quelen* foram baseados em sequências do catfish (*C. gariepinus* – número de depósito no NCBI: GU562470.1), southern catfish (*Silurus meridionalis* – número de depósito no NCBI: EU532191) (evolutivamente relacionados com a *R. quelen*) e zebrafish (*D. rerio* – número de depósito no NCBI: NM131057), depositadas no banco de dados público internacional da National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os produtos amplificados com os primers (Tabelas 1 e 2) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e as bandas com o peso molecular esperado foram extraídas do gel. Os produtos foram purificados por QIAEX II Agarose Gel Extraction Handbook (QUIAGEN), e clonados em pcDNA3.1/V5-HisTOPO vector (Invitrogen, Breda, The Netherlands). Em seguida, os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* quimicamente competentes e estas foram semeadas em meio de cultura Luria-Bertania (LB) contendo 1% de penicilina. Múltiplas colônias foram expandidas em cultura líquida de meio LB contendo 1% de penicilina. Destas colônias, os clones com a presença do inserto de interesse foram selecionadas por PCR. Depois disso, minipreps foram obtidos usando o QIAprep Miniprep Handbook (QUIAGEN) e submetidos a uma reação de sequenciamento utilizando BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer de acordo com as recomendações do fabricante.

A obtenção do cDNA parcial para o gene *vasa* foi confirmada por alinhamento com outras sequências já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando interface de BLASTN. A fim de obter o cDNA de comprimento completo para o *vasa*, a técnica RACE PCR foi realizada usando o SMART RACE cDNA amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) com módulo II SuperScript RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo do Kit. Foram utilizados 2 µg de RNA total tratado, e um oligo de RNA, que foi ligado ao extremo 5' do mRNA utilizando RNA ligase de T4. Após a transcrição reversa, utilizando SuperScrip II RT, foram realizadas as reações de PCR com seus primers específicos para a sequência. Os primers específicos foram desenhados a partir de sequências parciais anteriormente obtidas (Tabelas 1 e 2).

A técnica de amplificação com o RACE 3' e 5', consiste em um PCR com adaptadores, mostrado na Tabela 2, para amplificar o gene por inteiro, tanto no sentido 3' e 5' da fita de DNA e estas sequências foram clonadas e posteriormente sequenciadas.

Tabela 1. Lista de primers utilizados para RT-PCR, qRT-PCR e construção das sonda para hibridização *in situ*. Obs.: Acesso número de depósito no NCBI (National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)).

Gene			Sequência do Primer 5'-3'		Pares de Base
Nome	Finalidade	Acesso	Primer Forward	Primer Reverse	
<i>vasa</i>	RT-PCR/e iniciador para clonagem	GU562470.1 EU532191 NM131057	GGCAGAGGTGGGCGTGGGGGAAG	CCACGACCAATAATGTCAAGCAATCTTCCAGGG	750
<i>β-actina</i>	RT-PCR	EU527190	TGACCTGACTGACTACCTCA	AGCTCATAGCTCTTCTCCAG	179
<i>vasa</i>	Sonda p/ Hibridização <i>in situ</i>	AB649031	GGGCGGGTG <u>TTATTAACCCTCACTAA</u> G AGGCTATCATGACATTTGAAGAAG	CCGGGGGGTG <u>TAATACGACTCACTATAG</u> ACACAGGTGCCATAAGCA	384
<i>vasa</i>	qRT - PCR	AB649031	AGGCTATCATGACATTTGAAGAAG	CCATACTTCTGAACAGGGGT3	100

Tabela 2. Primers utilizados para a clonagem do cDNA do gene *vasa* de *R. quelen* utilizando o método RACE 5' e 3' PCR. Os primers foram desenhados com base em sequências de *C. gariepinus* (NCBI: GU562470.1), *S. meridionalis* (NCBI: EU532191) (evolutivamente relacionados com a *R. quelen*) e *D. rerio* (NCBI: NM131057) cDNA *vasa*. Obs.: Acesso número de depósito no NCBI (National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)).

Nome do Primer	Sequência (5'-3')
<i>vasa</i> Fw3'-UPM (4156)	CAACCCACCCAAGGCTATCATGACAATCATGACATTTGAAGAA
<i>vasa</i> FW3'-NUP (4157)	GCCCAATTGTGTGAGACACTGAACAAAAATGTTGCTAAGT
<i>vasa</i> Rv3'-NUP (4167)	ATTCAGACCTATGCACTTTGGATGGGGACAAGTCTTCATA
<i>vasa</i> Rv3'-UPM (4164)	CTAGAGTACCGAACACGGGTCTGACCTAGTCCCTT
<i>vasa</i> Rv3'-NUP (4165)	TATAGACGACCCTCCCTAGAGTACCGAACAC
<i>vasa</i> Rv3'-NUP (4166)	ACAAGTCTTCATACCTTAAGGGTAGTATAGACGACCC
<i>vasa</i> RV3'-UPM (4163)	CGACGGATAAGACGTCGTAGACTACTTACTTCCA
<i>vasa</i> RV3'-NUP (4159)	GCAGGACAACAGCAAATACCTCCGTGGTTGC
<i>vasa</i> RV3'-UPM (4158)	CGTGGTTGCAGCCTAAATGTTAGGCTCTTCAC

2.4. Comparação de domínios proteicos conservados e análise evolutiva

Para comparar a sequência obtida (2016 pares de base) foi codificada em uma proteína de 671 aminoácidos utilizando a plataforma ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Posteriormente, a sequência foi comparada com outras sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados do servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para localizar os sítios conservados dentro da proteína, foram realizados alinhamentos múltiplos com o ClustalX alignment software, que faz parte do pacote MEGA v.6.06 (Version Label) e, adicionalmente, alinhamentos com a ferramenta Clustalw2 disponível no servidor do The European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Para determinar os possíveis domínios da proteína, utilizou-se o pacote de ferramentas disponíveis no servidor Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

As análises evolutivas foram conduzidas pelo método Neighbor joining (NJ), que determina a distância filogenética, utilizando uma busca heurística com 1000 réplicas de iniciação. O método de Bootstrap (Felsenstein, 1985) foi utilizado para verificar a estatística numa reamostragem em relação à validade dos nós da árvore, gerando um total de 1000 repetições. Os resultados foram obtidos usando o software MEGA versão 6.06, através do qual foi gerado um cladograma de consenso sem enraizamento.

2.5. Expressão do *vasa* em diferentes tecidos por RT-PCR e qRT-PCR

Para avaliar os sítios de expressão do *vasa*, diferentes tecidos/órgãos de três machos e três fêmeas adultos de *R. quelen* (cérebro, brânquias, coração, fígado, músculo, intestino, rim, testículos e ovários) foram coletados. O RNA total destes tecidos foi extraído pelo método Trizol, conforme descrito anteriormente, seguido da síntese de cDNA, utilizando random hexamers e Superscript II, conforme especificações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Para avaliar a expressão do gene *vasa* de forma semi-quantitativa ou qualitativa foram realizadas reações de PCR a partir de concentrações de 10 ng dos cDNAs sintetizados através da transcrição reversa (citado anteriormente), num total de 25 µl de reação (GoTaq 1x, 10 µM dos primers Forward e Reverse, cDNA e água autoclavada Milli-q), utilizando o kit GoTaq Colorless Master Mix (Promega Corporation), seguindo normas do fabricante, sendo submetidos a 40 ciclos num termociclador comum (Biometra - Uniscience) (20s a 94°C, 35s a 58°C e 120s a 72°C). O produto da PCR foi separado em gel de agarose 1% e documentado em sistema fotoiluminador.

Os primers para reação da RT-PCR para o gene *vasa* de *R. quelen* foram desenhados utilizando como referência sequências do *vasa* publicadas no NCBI do catfish (*C. gariepinus* – número de depósito no NCBI: GU562470.1), southern catfish (*S. meridionalis* – número de depósito no NCBI: EU532191) e zebrafish (*D. rerio* – número de depósito no NCBI: NM131057) (Tabela 1). Também foram desenhados e sintetizados um conjunto de primers para a sequência do gene β -actina de *R. quelen* (Tabela 1) a partir de uma sequência de *Clarias batrachus* (número de depósito EU527190), utilizado como gene de referência β -actina para os RT-PCR (Tabela 1).

Os primers para a reação da qRT-PCR foram desenhados com base na sequência do *vasa* da tilápia (*O. niloticus*- número de depósito no NCBI: AB649031).

As análises de expressão gênica por qRT-PCR foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando SYBR Green kit (Invitrogen), 900 nM de primers (forward e reverse - Tabela 1) e cDNA das amostras dos tecido/órgãos

sintetizados previamente a partir de 1µg de RNA total utilizando Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), totalizando 20 µl por reação. As reações foram conduzidas sempre em duplicatas. Para o gene de referência 18S (human 18S rRNA – Invitrogen) foram realizadas reações utilizando TaqMan (Invitrogen) seguindo normas do fabricante. As reações foram submetidas a 40 ciclos (5 min. a 95°C, 40 ciclos de desnaturação à 95°C, 30 s. a 60°C e 30s a 72°C) utilizando o termociclador StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os níveis de expressão de cada alvo (Cts) foram normalizados pelo gene de referência 18S (human 18S rRNA – Invitrogen) e calibrados com a média dos Cts das amostras (testículo) através do método de ddCt.

2.6. Expressão do *vasa* durante o desenvolvimento embrionário e larval por RT-PCR e qRT-PCR

A expressão do *vasa* durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen* foi realizada por RT-PCR e qRT-PCR. Para tanto, o RNA total dos embriões/larvas foi extraído pelo método do Trizol, como anteriormente descrito, seguido da síntese de cDNA utilizando random hexamers e Superscript II, conforme especificações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Reações de RT-PCR e qRT-PCR foram realizadas utilizando primers específicos (Tabela 1). Reações de RT-PCR foram realizadas conforme descrição anterior. O gene de referência utilizado foi o β -actina (Tabela 1).

Para as análises de qRT-PCR, foram extraídos RNA total de três réplicas constituídas de um pool de embriões/larvas de aproximadamente 100 mg, cada. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total utilizando o kit Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As análises de qRT-PCR foram conduzidas da mesma maneira que anteriormente descrita, utilizando como gene endógeno de referência o 18S rRNA (human 18S rRNA - Invitrogen). A expressão relativa do *vasa* foi determinada pelo método de ddCt, descrito previamente (NÓBREGA *et al.*, 2010), no qual os níveis relativos de expressão do *vasa* (Cts) foram normalizados pelo gene de referência 18S rRNA (dCt) e posteriormente calibrados em relação aos valores de expressão do *vasa* para o tempo de 0 hpf (ddCt).

2.7. Hibridização *in situ*: cortes histológicos e embriões inteiros

Para localizar os sítios de expressão do *vasa* durante o desenvolvimento embrionário e também nas gônadas adultas, técnicas de hibridização *in situ* foram empregadas. Para tanto, sondas de RNA complementar (cerca de 400 pares de base) aos RNAm do gene alvo (*vasa*) foram construídas (Tabela 1). Desta forma, primers (forward e reverse) (Tabela 1) foram desenhados colocando o promotor SP6/T3 (indicado em vermelho na Tabela 1) e o promotor T7 (indicado em azul na Tabela 1) nas caudas 3' e 5' dos mesmos, respectivamente. A transcrição do cDNA linearizado contendo promotor T7 ou SP6 foi feita com RNA polimerase, U-DIG (digoxigenina) e outros provido pelo kit RNA Labeling (Roche) para gerar sondas senso e antisenso específicas marcadas com DIG, de acordo com metodologia previamente descrita (THISSE & THISSE 2008).

Para a hibridização *in situ* cromogênica (CISH) e fluorescente (FISH), os tecidos (testículos e ovários) foram fixados *overnight* em 4% paraformaldeído tamponado em PBS (pH 7,4) em condições livres de RNases, depois desidratados, diafanizados, incluídos em parafina (Paraplast®, Sigma), e seccionados 5µm de espessura. Posteriormente, as lâminas foram reidratadas e lavadas com PBT (tampão tris fosfato, pH: 7.4) e Tris HCl (0.05M, pH: 7.5). Logo após, o material foi tratado com proteinase K (20ug/ml) à 37°C por 20min, re-fixado com paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,4) em condições livres de RNases e incubado com solução de pré-hibridização (formamida deionizada 65%, tween 0,1%, ácido cítrico 0,184 M e citrato de sódio 20X) por 2,5hrs. Após a desnaturação da sonda através de choque térmico, as lâminas foram incubadas com solução de hibridização contendo a sonda de RNA do gene alvo à 70°C *overnight*. No segundo dia, a solução de hibridização foi removida e as lâminas foram lavadas intensamente com tampão citrato de sódio (SSC) e bloqueadas durante 2 h à temperatura ambiente com 1% de reagente de bloqueio (blocking reagent) (Roche). Em seguida, o material foi incubado com o anticorpo primário anti-DIG-AP (anti-digoxigenina conjugada com fosfatase alcalina) na diluição de 1:2000 na mesma solução de bloqueio à 4°C *overnight*. No terceiro dia, os tecidos foram lavados e incubados com solução de levamisol (0.24 mg/ml) no intuito de bloquear os sítios inespecíficos da fosfatase alcalina. A detecção da hibridização foi

feita cromogênica (CISH) com nitro azul de tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/ BCIP) (Sigma Aldrich) e por fluorescência com HNPP (fluorescent substrate for alkaline phosphatase) (FISH) (11758888001 Roche). Posteriormente as lâminas foram fotografadas no microscópio invertido Leica DMI 4000 BO.

Para a hibridização cromogênica de larvas inteiras do jundiá, foram realizadas os mesmos procedimentos descritos acima com adaptações do protocolo de THISSE & THISSE 2008. O material foi fotografado em estereomicroscópio Zeiss (SteREO Discovery. V20).

2.8. Análise estatística

Os resultados apresentados foram expressos através de média $\pm$ EP (erro padrão). Comparações entre as médias (entre os diferentes grupos; mais de 2) foram realizadas utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). O software Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização molecular do *Rqvasa*

A sequência completa de cDNA obtida do *vasa* de *R. quelen* foi de 2681 pares de bases (pb). Esta sequência é composta por uma região codificadora (open reading frame "ORF") com 2016 pb que contém em ambas as extremidades as regiões não codificantes denominadas UTR - 'untranslated terminal region'. A região não codificante 5' UTR (região anterior ao códon iniciador) apresenta 150 pb, enquanto a região 3' terminal UTR (região posterior ao stop códon) apresenta 515 pb, além do sinal de poliadenilação (aataaa) e a cauda poli - A (Figura 1).

A ORF de 2016 pb codifica 671 aminoácidos os quais contém oito sequências conservadas comuns aos membros pertencentes à família da proteína DEAD-box (LINDER *et al.*, 1989) (Figura 1).

Além desses domínios, apresenta uma região N - terminal rica em glicina e arginina, RGG e RG e a região C - terminal com extremidade ácida, composta por triptofano (W), ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D) (Figura 1).

cacagcaggctcacaggaccagct

cgacatttactatagccttcttcttagttcaaaccagtcctcacagcttcgagagatgtcacag
gaccagctcggcatttacagaccattattaaactatctgtatatctctcagctgtctgaacac
ATGGAGGACTGGGAAGATGAACAGAGCCCAGTTGTAACCAGCTTAACTCTGGGCAAAGCAGAA 63
M E D W E D E Q S P V V T S L T L G K A E 21
AATGCATGGAACAGCAATGGACAACAAAACGGCAAGGACAATGAAGAAAGTTCTTGAAACCT 126
N A W N S N G Q Q N G K D N E E S S W K P 42
GGTGCTGGTTTTGGGACTCAGGGGGGAAACAGAGATCGGGGTTTGGAAGTTGATGGAGAC 189
G A G F G T Q G G N R D R G F G K V D G D 63
TTCAAGGGCTTCAGAACAGGAATTGATGAAAATGCAAATGAAGGAGTTGATAATGGCCACTCC 252
F K G F R T G I D E N A N E G V D N G H S 84
TGGAACACTGGTGGAGAGGGCTTTAGCGGACGAGGAGGCAGAGGACGAGGAGGACGAGGAGGA 315
W N T G G E G F S G R G G R G R G G R G G 105
GGAAGAGGATTTAGGAATTCCTTCAAATCTGATGATGAAAATGCGAGTGATGAAGGTTTTAA 378
G R G F R N S F K S D D E N A S D E G F K 126
AGTGCTTTAGTGCGAGAGGTGGGCGTGGAGGAAGAGGAGGCCGTGGAGCTTTCCAACAAGGT 441
S G F S G R G G R G G R G G R G A F Q Q G 147
GGTGATGAAGAAGGCAAAGGACGCTTTGGTGGAGGCTATAGAGGACAGAACGAGGAGATATTT 504
G D E E G K G R F G G G Y R G Q N E E I F 168
TCAAAGGGATCACCAAAGGATAACGAGGAAAAAGAAGATGGTGAGACTGCAGGGCCTAAGGTC 567
S K G S P K D N E E K E D G E T A G P K V 189
AACTATATTCCACCGCCACCACCGGAAGAGGAGAACTCCATTTTTTCTCACTACGCAACAGGC 630
N Y I P P P P P E E E N S I F S H Y A T G 210
ATCAACTTTGACAGGTATGATGACATCCTGGTGGATGTAAGCGGAAGCAACCCACCCAAGGCT 693
I N F D R Y D D I L V D V S G S N P P K A 231
ATCATGACATTTGAAGAAGCCCAATTGTGTGAGACACTGAACAAAATGTTGCTAAGTCTGGA 756
I M T F E E A Q L C E T L N K N V A K S G 252
TACGTGAAACCTACCCCTGTTTCAAGATATGGAATTCCTCATATCTGCTGGGAGGGATCTC 819
Y V K P T P V Q K Y G I P I I S A G R D L 273
ATGGCTTGTGCCAGACTGGATCAGGGAACCGGCTGCCTTCCTGCTGCCTATTCTGCAGCAT 882
M A C A Q T G S G K T A A F L L P I L Q H 294
CTGATGAATGAAGGTTTAGCATCCAGCTTCACTGAGCTGCAGGAGCCTGAAGTCATCATT 945
L M N E G L A S S K F S E L Q E P E V I I 315
GTTGCGCCCACTCGGGAACCTCATTAATCAGATTTACCTAGAAGCCCGCAAGTTTGCTTATGGC 1008
V A P T R E L I N Q I Y L E A R K F A Y G 336
ACCTGTGTGCGTCCTGTTGTGCTTTATGGAGGCACCAACGTCGATTTACAATCCGAGAAGTG 1071
T C V R P V V V Y G G T N V G F T I R E V 357
TTAAAGGTTGCAATGTGCTGTGTGGGACCCCTGGAAGATTGCTCGACATTATTAACCGTGGA 1134
L K G C N V L C G T P G R L L D I I N R G 378
AAGGTTGGATTAAGTAAATTCGTTTTTGGTGCTGGATGAAGCTGATCGAATGTTGGATATG 1197
K V G L S K I R F L V L D E A D R M L D M 399
GGATTTGAGGCGGACATGCGAAAGCTGGTAACTCTCCAGGAATGCCTTCTAAAGAAGAGCGA 1260
G F E A D M R K L V N S P G M P S K E E R 420
CAAACCCTTATGTTCACTGCCACTTACCCGGAAGATATTCAGAAGCTGGCAGCCGACTTCCTA 1323
Q T L M F S A T Y P E D I Q K L A A D F L 441
AAGGTGGATTATCTGTTTCTGGCTGTGGGAGTAGTGGGAGGAGCCTGTAATGACATTGAGCAG 1386
K V D Y L F L A V G V V G G A C N D I E Q 462
CACATCATTCAGGTCAGTACTCAAAGAGGGAAAAGCTACTGGATCTGCTAAAGACTACA 1449

```

H I I Q V T Q Y S K R E K L L D L L K T T 483
GGGACACAGAGAACAATGGTCTTTGTTGAAACGAAACGAAGTGCAGATTTTCATTGCAACATTC 1512
G T Q R T M V F V E T K R S A D F I A T F 504
CTCTGTCAGGAAAAAATGCCCACTACAAGCATCCATGGCGATCGTGAACAGCGAGAGCGAGAG 1575
L C Q E K M P T T S I H G D R E Q R E R E 525
ACGGCTCTCCGTGATTTCCGCACAGGCCAATGTCCTGTGCTGGTAGCTACTTCTGTTGCTGCT 1638
T A L R D F R T G Q C P V L V A T S V A A 546
AGAGGACTAGACATTGAGCATGTCCAGCATGTGGTGAACCTTTGACCTGCCTAAAGAAATTGAT 1701
R G L D I E H V Q H V V N F D L P K E I D 567
GAGTATGTGCACCGCATTGGGAGAACGGGCCGATGTGGAAACACAGGAAGAGCCGTGTCTTTT 1764
E Y V H R I G R T G R C G N T G R A V S F 588
TTTGACCCGGAGGCCGATACTCCGTTGGCCCGCTCTCTGGTCAAAGTCCTTTCCGAGGCCAG 1824
F D P E A D T P L A R S L V K V L S E A Q 609
CAGGAAGTTCCTTCATGGCTGGAGGAAATTGCATTGGGTGCTCACGGTACCACAGGGTTTAAC 1890
Q E V P S W L E E I A L G A H G T T G F N 630
CCACGTGGTAAAGTGTTTGCCTCAACTGACTCTCGCAGGGGTGGATCCTTTACAAAGAACCTG 1953
P R G K V F A S T D S R R G G S F T K N L 651
GCACCACAACCAGCTGCACAAAGCACCGTCACTGCTGCCGCTGATGACGACGACTGGGAGTAG 2016
A P Q P A A Q S T V T A A A D D D D W E 672
attgacttttttttgttttttgttgtgcggtattcctctgttcattttttatacatattt
tatgttaaataagaggcctatgggccccaaagtataaagagaagagaatggcaggtcctgagc
tatggcactgaaagagccacaggttcaacctgaagttaagcttcacaatttaagttagtaaat
tttgagtgactgactttaactgcttgtgtgtttgcacttaaagatttttttgtttgttttg
ctgtgagagctcctagtaggctagacatcactgtgtggatcctgtagtacaaaaattacattg
agtttgtaaaagccttcagctcgaggttgcactctgtcactctttcatcaaataagctcttttctg
ccacatgtttccaggttgatattttggtcactataatttgtgtgaaggcagttgtcgaaaaaaa
aagttgttttgctattacaataaaattcacacaatagaaatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa

```

Figura 1 - Sequência completa dos nucleotídeos e aminoácidos do gene *vasa* de jundiá (*R. quelen*). Números a direita indicam o número de nucleotídeos codificantes, e abaixo os aminoácidos codificados. Nos 'boxes' estão as sequências conservadas da proteína Vasa. A região N-terminal apresenta domínio rico em arginina (R) e glicina (G), **RG** e **RGG**. A região C-terminal tem caráter ácido, composta por triptofano (W), ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D) (em negrito). Em laranja está destacado o stop codon (TAG). O sinal de poliadenilação (aataaa) e a cauda poli A estão sublinhados. A sequência apresentada encontra-se depositada no NCBI no GenBank com um número de acesso KF640082.

3.2. A sequência de aminoácidos

A sequência obtida foi comparada com outras sequências e os domínios da proteína determinados (Figura 2). O domínio da superfamília DEAD/DEAH box helicase (DEAD) (180 aminoácidos) vai do aminoácido 257 até o 436 (marcado em vermelho na Figura 2 A , ou indicado na caixa vermelha na Figura 2 B), e o domínio da superfamília Helicase C-terminal (Helicase C) (77 aminoácidos) vai de 504 até o 580 (marcado em azul Figura 2 A ou indicado na caixa azul da Figura 2 B).

A

MEDWEDEQSPVVTSLTLGNAENAWNSNGQNGKDNEESSWKPGAGFGTQGGNRDRGFGKVDGDFKG
 FRTGIDENANEGVDNGHSWNTGGEGFRGRGRGRGRGRGRGRFRNSFKSDDENASDEGFKSGFSGR
 GGRGGRGGRGAFQGGDEEGKGRFGGGYRQNEEIFSKGSPKDNEEKEDGETAGPKVNYIPPPPE
 EENSIFSHYATGINFDYDDILVDVSGSNPPKAIMTFEEAQLCETLNKNVAKSGYVKP**TPVQKYGI**
PIISAGRDLMACAQTGSGKTA AFLLPILQHLMNEGLASSKFSELQEPEVIIVAPTRELINQIYLEA
RKFAYGTCVRPVVVYGGTNVGFTIREVLKGCNVLCGTPGRLLDIINRGKVGLSKIRFLVLDEADRM
LDMGFEADMRKLVNSPGMPSKEERQTLMF SATYPEDIQKLAADFLKVDYLFLAVGVVGGACNDIEQ
 HIIQVTQYSKREKLLDLLKTTGTQRTMV FVETKRSADFIAT**FLCQEKMP TTSIHGDREQRERETAL**
RDFRTGQCPVLVATSVAARGLDIEHVQHVVNFDLPKEIDEYVHRIGRTGRCGNTGRAVSFFDPEAD
 TPLARSLVKVLSEAQQEVPSWLEEI ALGAHGTTGFNPRGKVFASTDSRRGGSFTKNLAPQPAQST
 VTAAADDDDDWE*

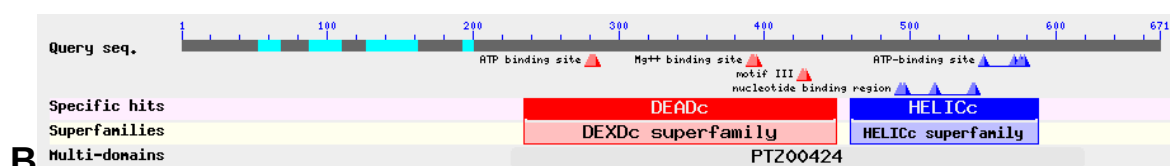


Figura 2 - Sequência de aminoácidos para a proteína Vasa da *R. quelen*. (A) Em vermelho está indicado o domínio da superfamília DEAD (aminoácido 257 até 436) e em azul o domínio da superfamília Helicase C (aminoácido 504 até o 580); (B). Domínios da proteína Vasa de jundiá. Caixa vermelha indica o domínio da superfamília DEAD, e caixa em azul indica o domínio da superfamília Helicase C. Em (A), O amarelo indica o aminoácido iniciador (M) e em azul (*) o stop códon.

3.3. Comparação de domínios proteicos do Vasa e análise evolutiva

A Figura 3, ilustra a comparação entre os domínios da superfamília DEAD/DEAH box helicase (DEAD) (caixa verde) e da superfamília Helicase C-terminal (Helicase C) (caixa vermelha) em diversos vertebrados, incluindo peixes e um invertebrado. Interessantemente, a sequência de aminoácidos destas superfamílias mostra-se bastante conservada entre as espécies, conforme mostram os asteriscos na Figura 3. Além disso, dentro de cada superfamília, são encontrados domínios, também altamente conservados (delimitados por um contorno amarelo dentro de cada superfamília na Figura 3), sendo seis dentro da superfamília DEAD e dois dentro da superfamília Helicase C. Os domínios pertencentes à superfamília DEAD são ATPase-A (Domínio I) (AQTGSGKT), domínio IA (PTREL), domínio IB (GG), domínio IC (TPGRL), ATPase-B (Domínio II) (DEAD) e domínio III (SAT) e os domínios pertencentes a superfamília Helicase C são o domínio IV (ARGLD) e o domínio V (GRTGR).

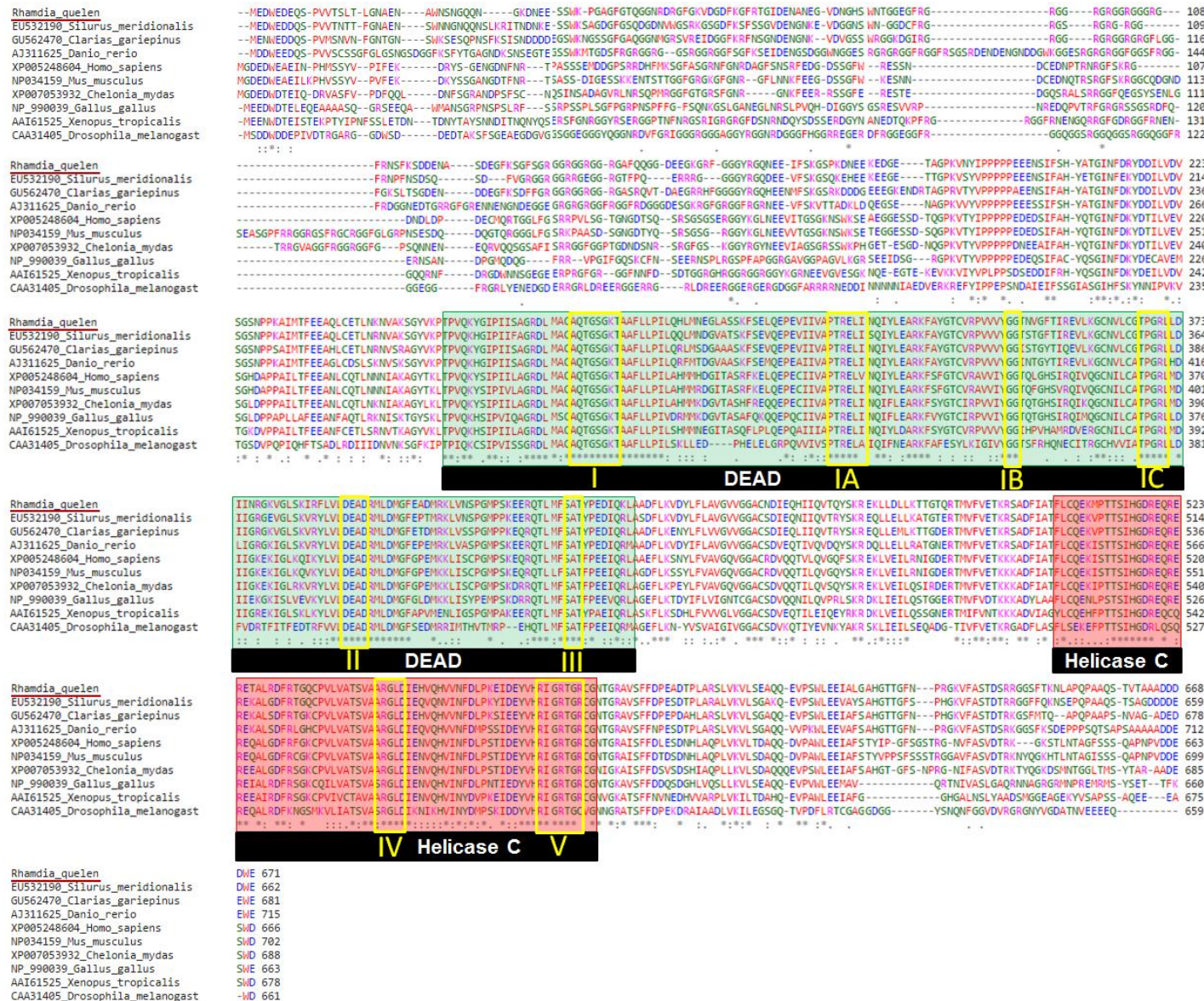


Figura 3 - Comparação das sequências de aminoácidos do gene *vasa* entre várias espécies. O alinhamento foi realizado utilizando o Clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Asteriscos (*) indicam os sítios conservados dos aminoácidos; dois pontos (:) indicam uma forte pontuação (sítios com menos variações entre aminoácidos comparados), e um ponto (.) uma fraca pontuação (sítios com grande variação entre aminoácidos comparados) de acordo com a comparação de alinhamento utilizando o ClustalW. Caixa verde indica o domínio da superfamília DEAD e caixa vermelha indica o domínio da superfamília Helicase C da proteína. Caixa amarela circula os oito domínios dentro destas superfamílias (Domínio I (AQTGSGKT), domínio IA (PTREL), domínio IB (GG), domínio IC (TPGRL), Domínio II (DEAD), domínio III (SAT), domínio IV (ARGDL) e o domínio V (GRTGR).

Phylogenetic tree showing relationships between various species, including fish, amphibians, reptiles, birds, mammals, and invertebrates. The tree is rooted at the bottom left with *Drosophila melanogaster*. A scale bar at the bottom left indicates 0.02. A bracket on the left side of the tree is labeled "Fish (Teleostei)". On the right side, various groups are labeled: Perciformes, Pleuronectiformes, Beloniformes, Synbranchiformes, Cyprinodontiformes, Perciformes, Scorpaeiformes, Perciformes, Pleuronectiformes, Gadiformes, Anguiliformes, Salmoniformes, Siluriformes, Cypriniformes, Amphibious, Reptiles + Birds, Mammals, and Invertebrate, Insect. Images of representative species are shown on the right: a salmon, a catfish, a blue catfish, and a zebrafish.

Species listed (from top to bottom):

- GU581283 *Auxis thazard*
- GU581282 *Auxis rochei*
- GU581280 *Euthynnus affinis*
- GU581281 *Katsuwonus pelamis*
- EU253482 *Thunnus orientalis*
- GQ404693 *Scomber japonicus*
- GU581279 *Scomber australasicus*
- JQ070418 *Paralichthys olivaceus*
- JX235364 *Scopthalmus maximus*
- NM_001104676 *Oryzias latipes*
- DQ174775 *Monopterus albus*
- JX80071 *Kryptolebias marmoratus*
- AB378581 *Pagrus major*
- JQ756458 *Lateolabrax japonicus*
- GU987023 *Dicentrarchus labrax*
- GQ422440 *Osphronemus goramy*
- GQ404692 *Nibea mitsukuri*
- JX457332 *Larimichthys crocea*
- JN634874 *Sebastes schlegelii*
- AB649033 *Oreochromis niloticus*
- JF732758 *Oreochromis aureus*
- AB098252 *Leucopsaron petersii*
- GU596411 *Seriola quinqueradiata*
- AB362788 *Trachurus japonicus*
- JN564594 *Solea senegalensis*
- HM451456 *Gadus morhua*
- BAO21641 *Anguilla japonica*
- NM_001124193 *Oncorhynchus mykiss*
- NM_001279129 *Salmo salar*
- EU448254 *Salvelinus leucomaenis*
- GU562470 *Clarias gariepinus*
- EU532190 *Silurus meridionalis*
- Rhambdia quelen
- GQ140633 *Ctenopharyngodon idella*
- KC207126 *Culter ilishaeformis*
- JQ339739 *Gobiocypris rarus*
- AB531493 *Misgurnus anguillicaudatus*
- AY821684 *Carassius auratus*
- AF479820 *Cyprinus carpio*
- AJ311625 *Danio rerio*
- AA161525 *Xenopus tropicalis*
- NP_990039 *Gallus gallus*
- XP007053932 *Chelonia mydas*
- XP005248604 *Homo sapiens*
- NP_034159 *Mus musculus*
- CAA31405 *Drosophila melanogaster*

Groups and representative images:

- Perciformes
- Pleuronectiformes
- Beloniformes
- Synbranchiformes
- Cyprinodontiformes
- Perciformes
- Scorpaeiformes
- Perciformes
- Pleuronectiformes
- Gadiformes
- Anguiliformes
- Salmoniformes
- Siluriformes
- Cypriniformes
- Amphibious
- Reptiles + Birds
- Mammals
- Invertebrate, Insect

Figura 4 - Análises evolutivas do Vasa pelo método de distância filogenética, *Neighbor joining* (NJ). Uma busca heurística foi utilizada com 1000 réplicas de *bootstrap* (O número indicado acima do ramo mostra a sustentação estatística da relação, 50 > ou = indicando um bom suporte). É possível ver a proximidade filogenética do Vasa entre *R. quelen* (jundiá), *C. gariepinus* (bagre africano) e *S. meridionalis* (bagre do rio).

3.4. Expressão do *Rqvasa* em diferentes tecidos

A expressão do *Rqvasa* em diferentes tecidos/órgãos (cérebro, brânquias, coração, fígado, músculo, intestino, rins, testículos e ovários) foi avaliada por qRT-PCR (Figura 5 A) e também por RT-PCR (Figura 5 B), em adultos de ambos os sexos. Os resultados da RT-PCR e qRT-PCR mostraram que *Rqvasa* foi expresso apenas nas gônadas, sendo significativamente mais expresso nos ovários do que nos testículos adultos do Jundiá.

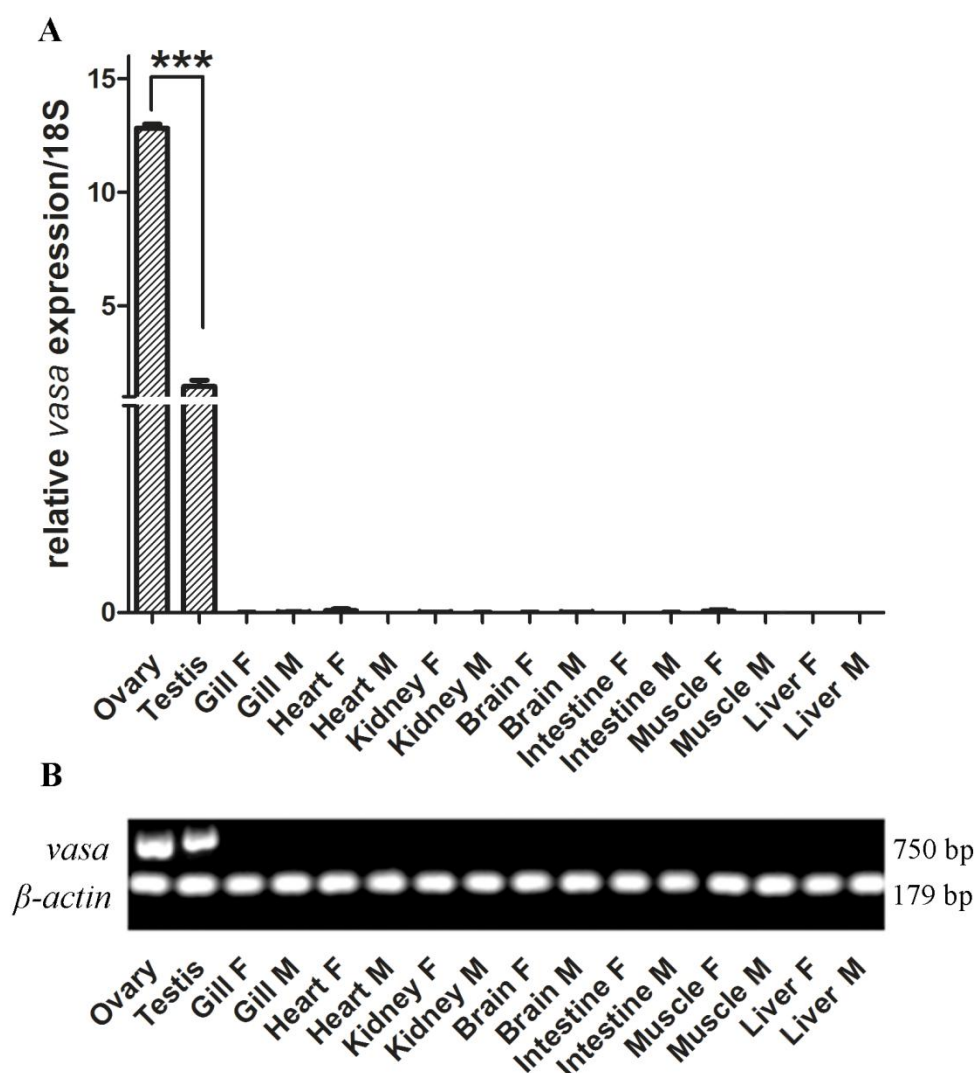


Figura 5 - Expressão do *vasa* em diversos tecidos/órgãos de *R. quelen* adulto. **(A)**: Expressão do gene *vasa* por qRT-PCR para ambos os sexos. A expressão foi avaliada nas gônadas (testículo e ovário), brânquias, coração, rins, cérebro, intestino, músculo e fígado de ambos os sexos. A expressão foi normalizada pelo gene de referência *18S* e os valores expressos em relação aos níveis de *vasa* no testículo. **(B)**: Análise por RT-PCR utilizando primers específicos para o gene *vasa*, nos mesmos tecidos/órgãos em ambos os sexos. O gene β -actina foi utilizado como controle positivo no padrão de amplificação do cDNA. M indica macho e F fêmea. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

3.5. Expressão do *Rqvasa* em diferentes estágios embrionários e larval

A expressão do *Rqvasa* foi avaliada em diferentes períodos do desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen*. Na Figura 6 é possível observar algumas das etapas da ontogênese dos indivíduos analisados.

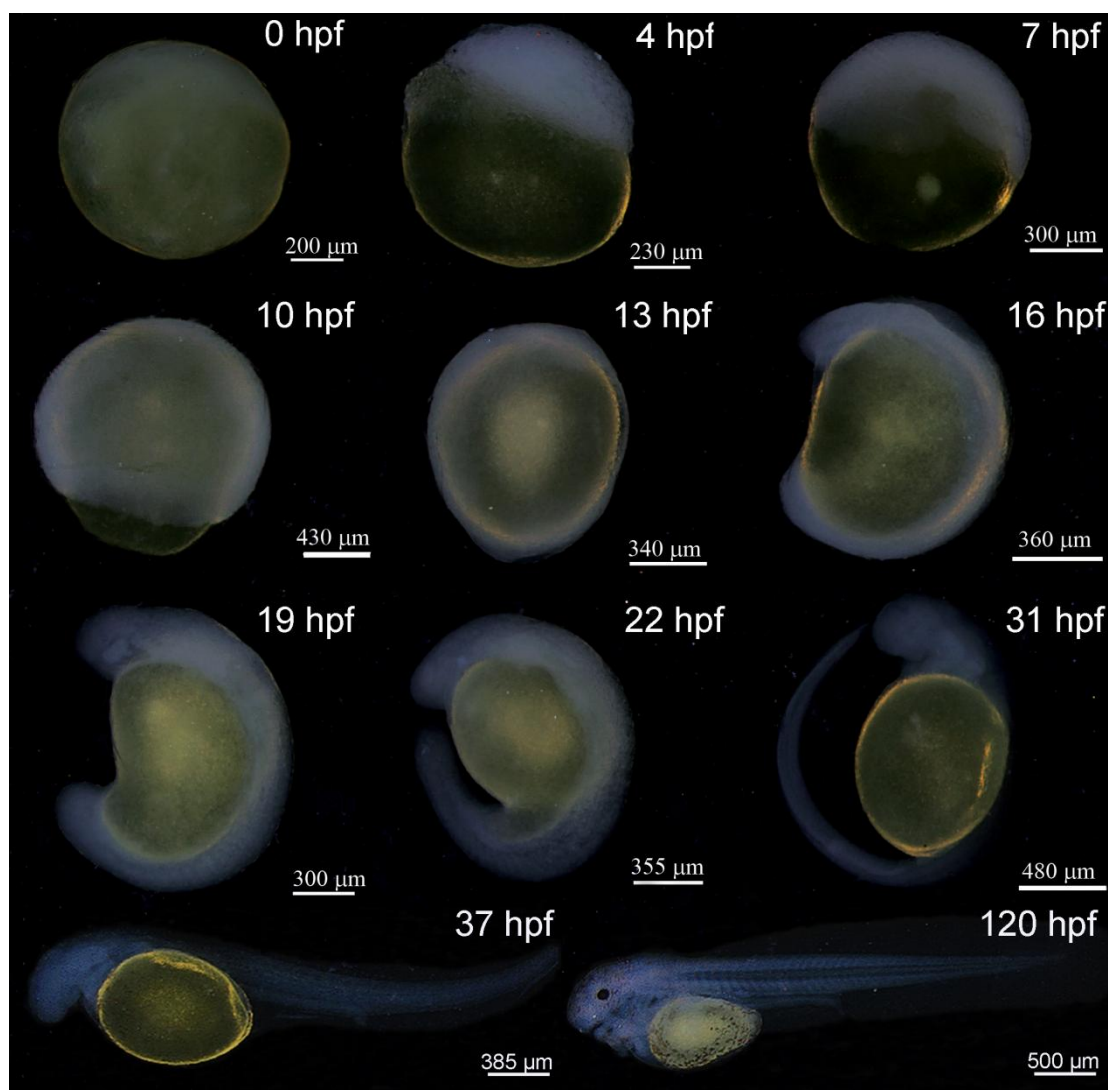


Figura 6 - Desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen*. Ovo recém fertilizado (0 hpf). Clivagem e Blastulação (4 a 7 hpf). Gastrulação (10 a 13 hpf). Somitogênese (16, 19 e 22 hpf). Eclosão (31 e 37 hpf). Pigmentação dos olhos e abertura da boca (120 hpf). Horas pós-fertilização (hpf).

A análise da expressão do *Rqvasa* por RT-PCR durante o desenvolvimento embrionário e larval, mostrou a presença de transcritos primários de *Rqvasa* em todos os períodos avaliados, desde o estágio de 0 horas pós-fertilização (hpf), logo após a fecundação do oócito com espermatozoide, até a larva com 264 hpf (Figura 7 B). Nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (0, 4, 7 e 10

hpf) foi possível observar bandas com sinais mais intensos quando comparados com os estágios subsequentes (Figura 7B), indicando desta forma uma maior expressão do gene *vasa*. O gene β -actina foi utilizado como controle positivo endógeno (Figura 7B).

Análises de qRT-PCR (Figura 7 A) confirmam os resultados qualitativos do RT-PCR. A expressão relativa de *Rqvasa* é significativamente maior no estágio de 0 hpf, o que corresponde ao estágio de zigoto (Figura 7 A). Com as primeiras clivagens do embrião (4 hpf), a expressão do *Rqvasa* apresenta uma pequena redução em seus níveis relativos quando comparados a 0 hpf (Figura 7 A). Na blastulação (7 hpf), a expressão do *vasa* diminui significativamente e gradativamente até a gastrulação (Figura 7 A). Durante a gastrulação (10-13 hpf), somitogênese (16-37 hpf) e estágio larval (43-264 hpf), a expressão relativa do *Rqvasa* manteve-se constante durante o período avaliado. A expressão foi normalizada pelo gene de referência *18S* e os expressos em relação ao tempo 0 hpf. Para efeitos comparativos, a expressão relativa do *vasa* nos testículos adultos também está mostrada na Figura 7 A.

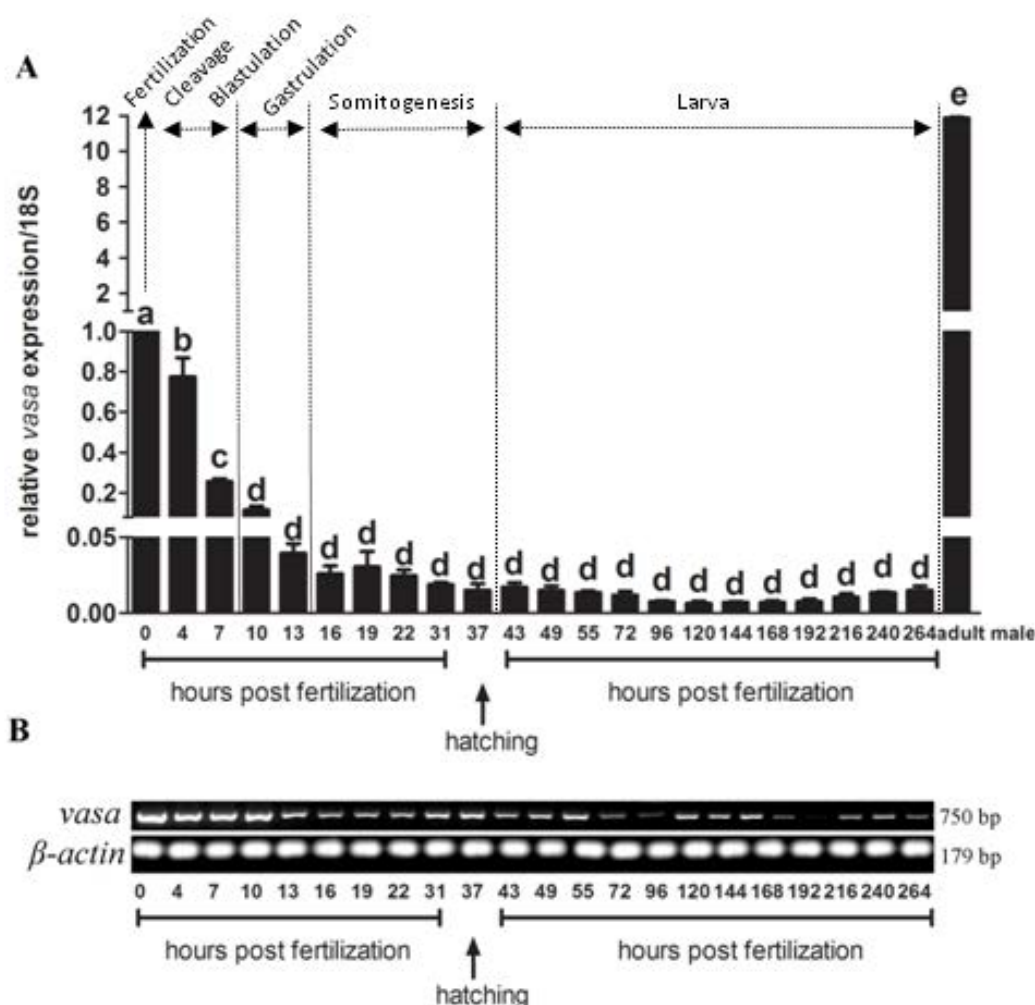


Figura 7 - Expressão do *vasa* em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen*. (A): Níveis relativos de RNAm do *vasa* utilizando PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os níveis expressos foram avaliados desde o momento 0 hora pós-fertilização (hpf) até a larva com 264 hpf. A expressão foi normalizada pelo gene de referência *18S* e os valores expressos em relação ao tempo 0 hpf. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$, one way ANOVA). (B): Análise por RT-PCR utilizando primers específicos para o gene *vasa*, nos mesmos períodos avaliados acima. O gene β -actina foi utilizado como controle positivo no padrão de amplificação do cDNA.

3.6. Hibridização *in situ* durante o desenvolvimento embrionário e larval

Os sítios de expressão de *Rqvasa* foram identificados durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen* através de hibridização *in situ* cromogênica (CISH). Conforme esperado, os transcritos primários de *Rqvasa* localizam-se nas células germinativas primordiais (CGPs) (Figuras 8, 9). No embrião com 10 hpf no estágio de gastrulação com 90% de epibolia completa o RNAm do *vasa* é encontrado nas CGPs da região dorsal do embrião, onde as CPGs aparecem translocando-se do epiblasto em direção ao hipoblasto (Figuras

8 A, B, 9). Com 19 hpf, no embrião em processo de somitogênese, o *Rqvasa* se expressa nas CGPs que neste momento estão associadas à camada sincicial do vitelo (Figuras 8 C, 9).

Nos seguintes estágios, as larvas com 37, 43, 55, 72, 96 e 120 hpf (Figuras 8-D, 8-E, 8-F, 8-G, 8-H, 8-I, 9) apresentaram expressão do *Rqvasa* nas CGPs em seu processo migratório em direção ao primordial gonadal. É possível visualizar a migração ocorrendo pelo mesentério dorsal (Figuras 8 - J, 8 - L, 9).

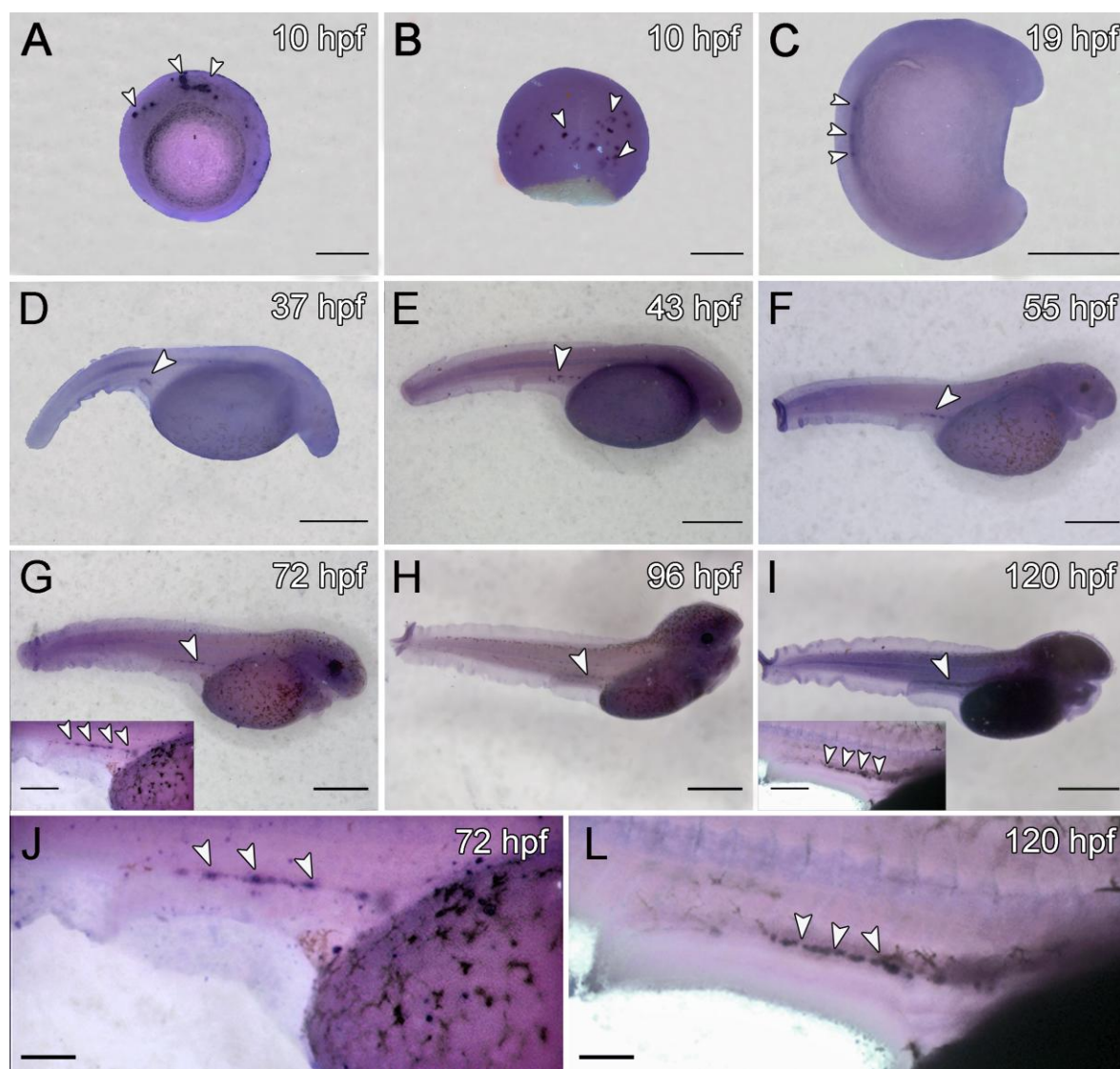


Figura 8 - Hibridização cromogênica feita no tecido inteiro durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen*. (A) Visão ventral do embrião no estágio da gastrulação (10h) com 90% da epibloia completa, pontos escuros marcados indicam a migração das células germinativas primordiais (CGPs) translocando-se do epiblasto para o hipoblasto. (B) Visão lateral do embrião no estágio da gastrulação (10h) com 90% da epibloia completa. (C) Embrião no estágio de 19 hpf onde as CGPs estão associadas à camada sincicial do vitelo. (D, E, F, G, H, I, J, L) Durante o desenvolvimento larval, a marcação das CGPs aparece no mesentério dorsal, indicando a migração destas células em direção ao primórdio gonadal. Cabeças de setas indicam a localização das CGPs. Barras: A, B, C, D, E, F, G, H, I = 500 µm. J, L = 100 µm.

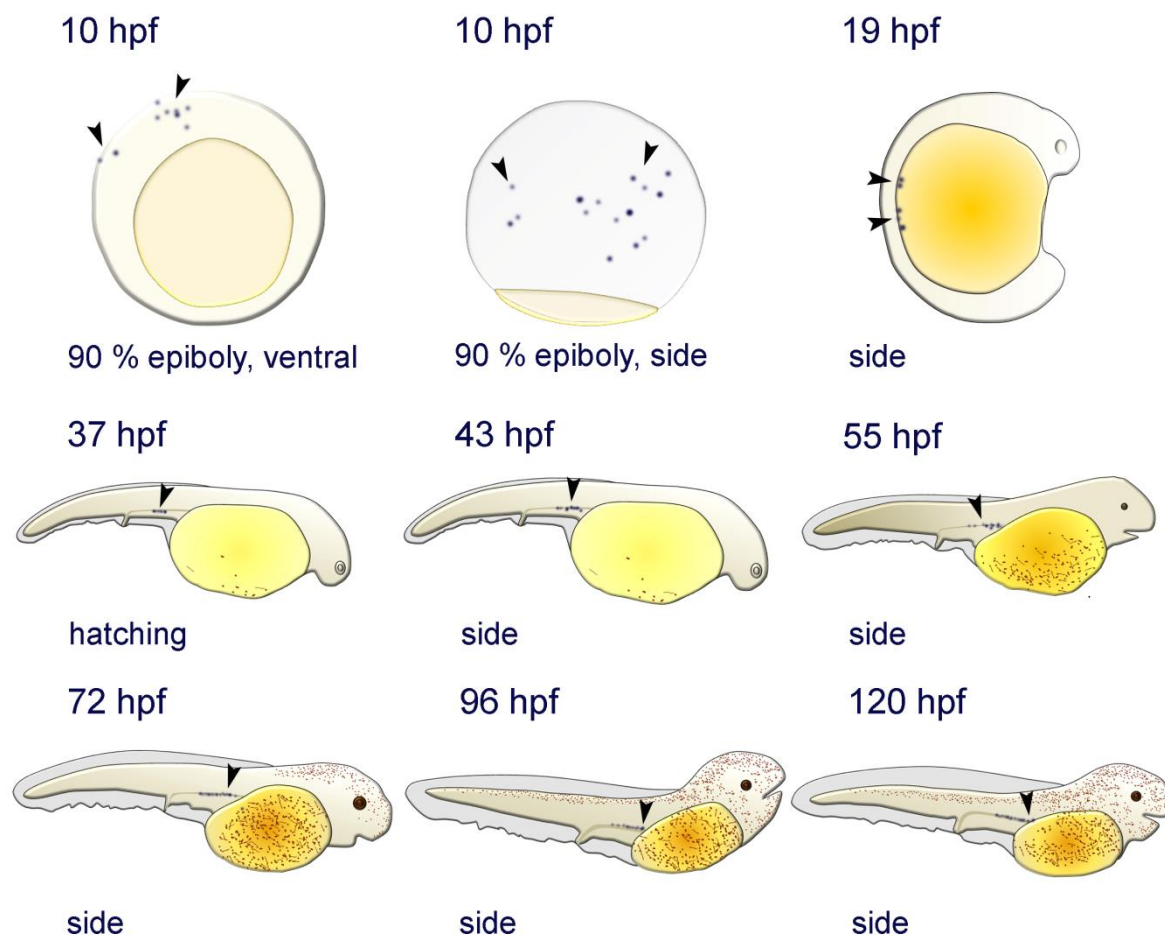


Figura 9 - Esquema ilustrando a migração das células germinativas primordiais em embriões e larvas de *R. quelen*, através da técnica de hibridização cromogênica (CISH) feita no indivíduo inteiro. Cabeças de setas indicam a posição das CGPs no processo migratório.

3.7. Hibridização *in situ* das gônadas

Os sítios de expressão de *Rqvasa* nos testículos e ovários de *R. quelen* foram identificados através de hibridizações *in situ* cromogênica (CISH) em cortes histológicos (ovário e testículo), CISH no tecido inteiro (ovário) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em cortes histológicos de testículo, utilizando uma sonda senso e antisenso de RNA, como descrito na metodologia.

No ovário, o *Rqvasa* é expresso principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento oocitário (Figura 10 A). Nos oócitos perinucleolares em estágios iniciais, os transcritos primários do *vasa* ocorrem no citoplasma, e também

fortemente no núcleo (Figura 10 D). Nos oócitos perinucleolares tardios, o *vasa* encontra-se nos nucléolos, no citoplasma e no corpúsculo de Balbiani (cabeças de setas) (Figura 10 C). Esta marcação indica uma possível transição dos transcritos do *vasa* para a periferia do núcleo e também uma difusão dos mesmos para o citoplasma concentrando-se na região do corpúsculo de Balbiani.

Nos oócitos em estágio pré-vitelogênico (pv), *Rqvasa* apresenta-se uniformemente distribuído no citoplasma destes oócitos (Figura 10 D). Por fim, nos oócitos vitelogênicos, os transcritos primários do *vasa* localizam-se na região cortical/periférica da célula. No entanto, nestes oócitos, o sinal é evidentemente menos intenso, devido a diminuição da expressão ou dispersão do RNA do *vasa*. Na ISH no tecido inteiro, as células germinativas iniciais são as que visivelmente apresentam intensa expressão do *vasa* (Figura 10 E).

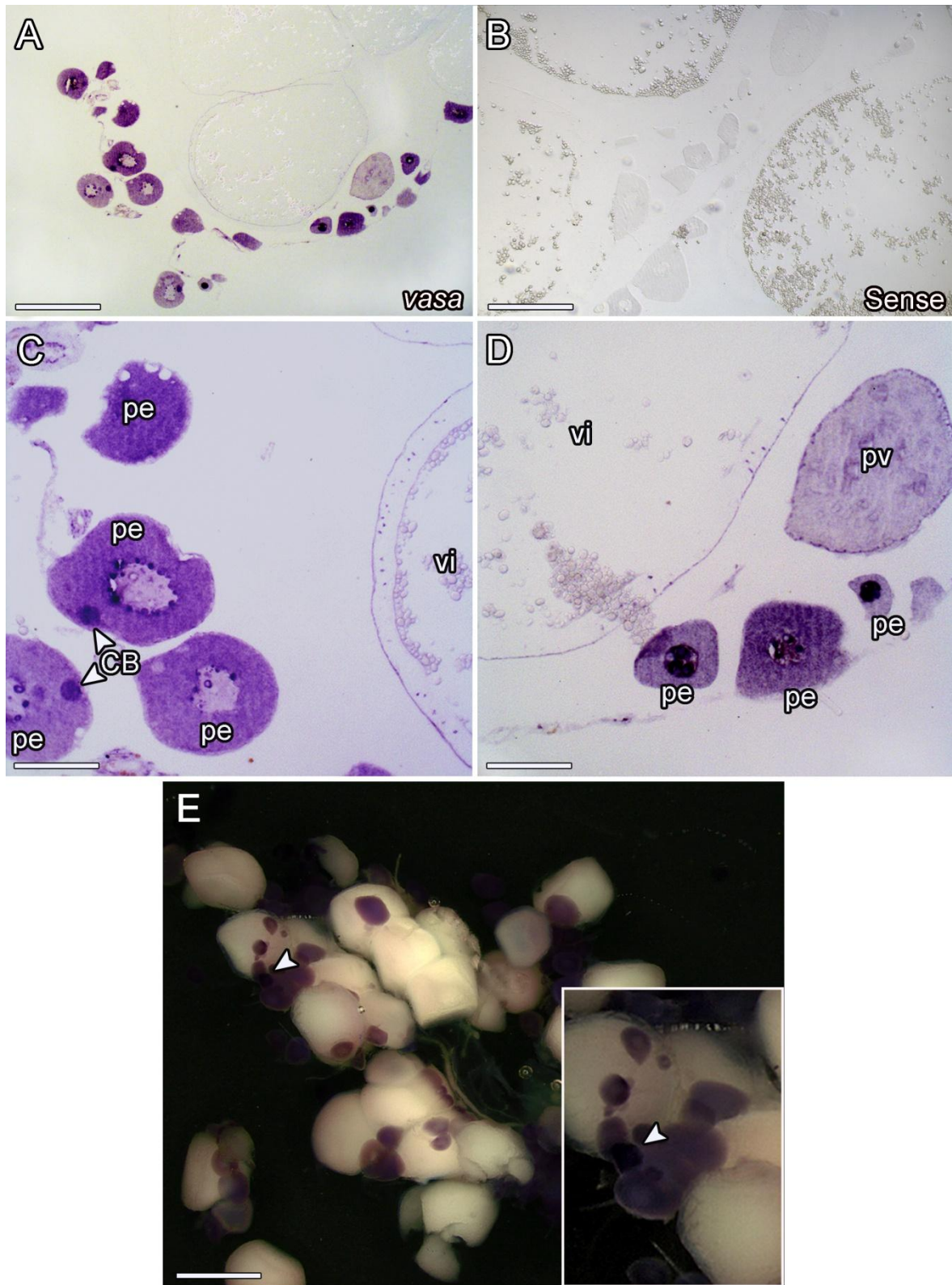


Figura 10 - Identificação dos sítios de expressão do *Rqvasa* em ovários de *R. quelen*, através da hibridização *in situ* cromogênica em cortes histológicos incluídos em parafina e por hibridização *in situ* no tecido inteiro. (A) Expressão do *Rqvasa* no ovário utilizando sonda complementar antisense (T7). (B) Hibridização *in situ* utilizando sonda senso como controle negativo. (C) Expressão do *vasa* no citoplasma dos oócitos perinucleolares, no corpúsculo de Balbiani (CB), no núcleo e nucléolos. No oócito vitelogênico o sítio de expressão do *Rqvasa* encontra-se na periferia do citoplasma dos oócitos. (D) Marcações intensas no núcleo indicam alta expressão dos transcritos primários de *vasa* nos oócitos perinucleolares (E) Hibridização no

ovário inteiro, cabeças de seta indicam marcação intensa nos oócitos durante as etapas iniciais da oogênese. PE= perinucleolar, PV= pré vitelogênico, VI= vitelogênico. Barras: A= 400 µm; B= 270 µm; C, D= 170 µm; E= 1000 µm.

Os testículos sexualmente maduro de *R. quelen* uma grande quantidade de espermatozoides em seu lúmen, assim como epitélio germinativo composto por cistos com células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 11 A). Os transcritos primários de *Rqvasa* localizam-se nos cistos contendo células germinativas em diferentes etapas de desenvolvimento (Figura 11 C). As espermatogônias são as células germinativas que aparecem com uma marcação mais intensa, os espermatócitos apresentam sinais moderados e as espermátides sinais fracos, e os espermatozoides não apresentam marcação para a expressão do *vasa* (Figura 11 D).

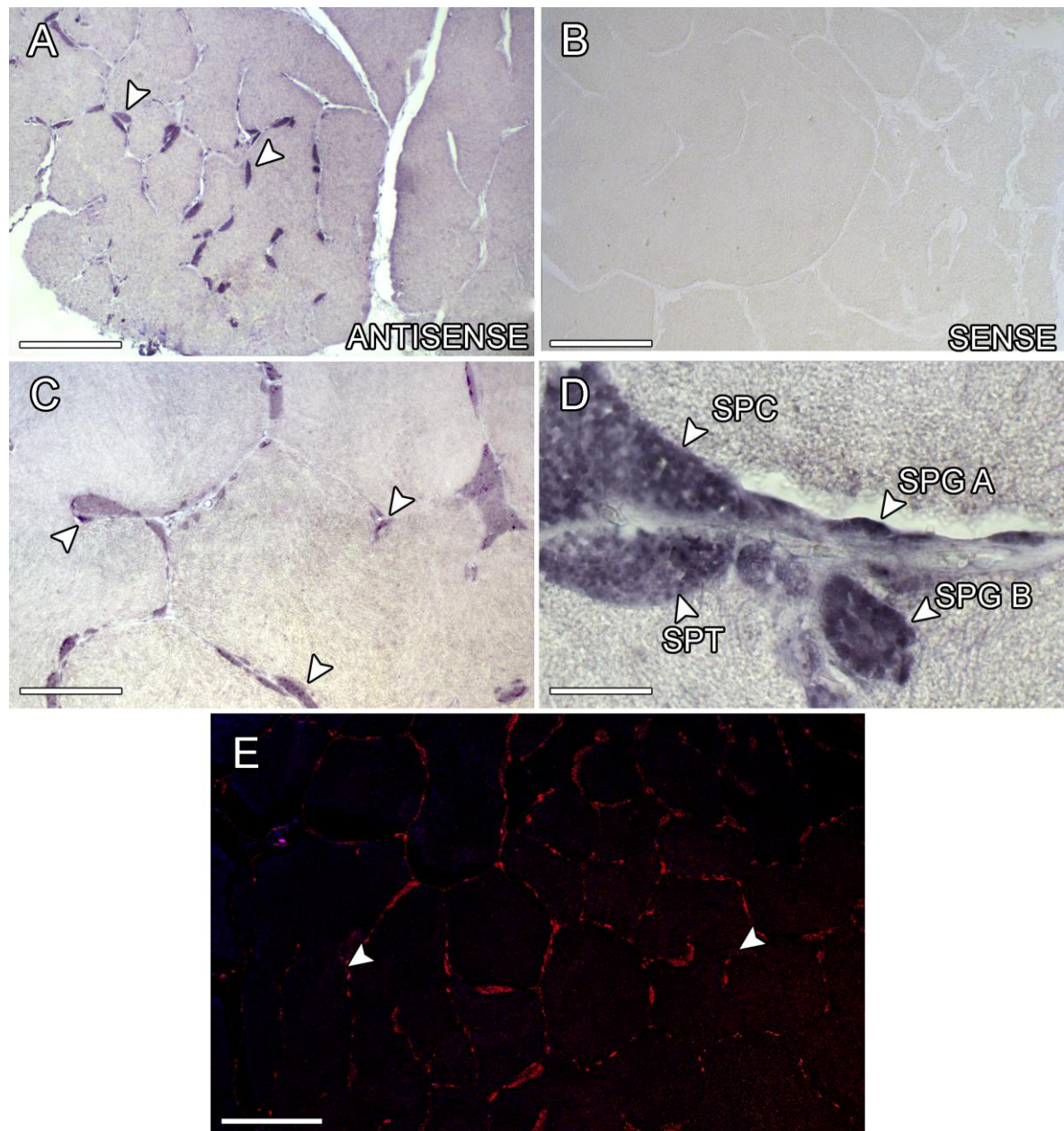


Figura 11 - Hibridização *in situ* cromogênica (CISH) e fluorescente (FISH) em cortes histológicos incluídos em parafina, indicando o sítio de expressão de *Rqvasa* nos testículos de *R. quelen*. (A) Hibridização utilizando sonda antisense (T7), setas indicam a presença dos transcritos primários de *Rqvasa* nos testículos. (B) Hibridização utilizando sonda senso (T3) como controle negativo. (C) Cabeças de setas indicam que o *vasa* é expresso em cistos de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento. (D) Aumento de 100x, evidenciando que o *Rqvasa* se expressa fortemente nas gerações espermatogoniais (SPG A e SPG B) quando comparadas com cistos de espermatócitos e espermatídes expressam fortemente. (E) Hibridização *in situ* fluorescente mostrando os cistos marcados e o lúmen contendo apenas espermatozoides sem marcação. SPG A, espermatogônia do tipo A; SPG B, espermatogônia tipo B; SPC, espermatócito; SPT, espermatíde. Barras: A, B= 50 μ m. C= 60 μ m. D= 25 μ m. E= 125 μ m.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou a sequência completa do cDNA de *vasa* de *R. quelen* e analisou sua expressão em diferentes tecidos e também durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen*. Nesta caracterização foi obtida uma sequência de cDNA de 2016 pares de bases, que codifica uma proteína de 671 aminoácidos. O número de pares de base e aminoácidos obtidos são semelhantes aos encontrados em *D. labrax*, no qual o cDNA do *vasa* corresponde a 1911 pares de bases, codificando uma proteína de 637 aminoácidos (BLÁZQUEZ *et al.*, 2011). Em *Paralichthys olivaceus*, também foram isolados cDNA com 1941 pares de bases que codificam uma proteína de 646 aminoácidos (WU *et al.*, 2014). Tanto em *R. quelen* quanto em *D. labrax* (BLÁZQUEZ *et al.*, 2011) e *P. olivaceus* (WU *et al.*, 2014), foram encontrados um domínio da superfamília Helicase C na extremidade C-terminal e um domínio DEAD na extremidade N-terminal, ambos característicos da família de proteínas Vasa. Além disso, também foram encontrados oito domínios, altamente conservados distribuídos nestas duas superfamílias. Os domínios pertencentes à superfamília DEAD são o domínio I (ATPase-A) (AQTGSGKT), domínio IA (PTREL), domínio IB (GG), domínio IC (TPGRL), domínio II (ATPase-B) (DEAD) e domínio III (SAT), e os domínios pertencentes a superfamília Helicase C são o domínio IV (ARGLD) e o domínio V (GRTGR), indicando que o *vasa* clonado é homólogo dentro do grupo dos peixes teleósteos e que estão evolutivamente distantes dos demais vertebrados (BLÁZQUEZ *et al.*, 2011, WANG *et al.*, 2014, WU *et al.*, 2014, ÚBEDA-MANZANARO *et al.*, 2014).

Análises evolutivas, demonstram que a proteína Vasa é conservada entre *R. quelen*, *C. gariepinus* e *S. meridionalis*, os quais pertencem ao grupo dos Siluriformes, como já indicado em trabalhos anteriores (BLÁZQUEZ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014 e ÚBEDA-MANZANARO *et al.*, 2014). Nossos resultados de relação evolutiva também mostram que a ordem Siluriformes se relaciona com Cypriniformes, estes com Salmoniformes, e por fim os Anguiliformes com o restante dos peixes (Teleósteos), indicando um monofiletismo para a proteína

Vasa dentro do grupo peixes como observado por outros autores (WANG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Além da caracterização do vasa de forma inédita em uma espécie nativa, *R. quelen*, também foi realizada a análise espaço-temporal da expressão do mesmo durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen*.

A avaliação da expressão do *Rqvasa* por qRT-PCR e RT-PCR em diferentes tecidos/orgãos de machos e fêmeas adultos, mostrou que o *Rqvasa* é expresso somente nas gônadas de *R. quelen*, sendo mais expresso nos ovários do que nos testículos. Essa especificidade também foi encontrada em outros vertebrados e invertebrados, como em *Caenorhabditis. elegans* (GRUIDL *et al.*, 1996), *D. melanogaster* (HAY *et al.*, 1988), *Xenopus*, (IKENISHI *et al.*, 1996), bem como nos teleósteos *D. rerio* (YOON *et al.*, 1997) e *C. gariepinus* (RAGHUVeer *et al.*, 2010). Embora sua expressão seja específica em gônadas, alguns estudos relataram a expressão do vasa extra-gonadal, como em *D. labrax* (BLASQUEZ *et al.*, 2011;), *A. japonicus* (YAN *et al.*, 2013), *Solea senegalensis* (PACCHIARINI *et al.*, 2013), no entanto, os níveis encontrados são poucos expressivos e a função do gene nesses tecidos ainda é desconhecida. Devido a proteína Vasa ser uma helicase, sua função extra-gonadal poderia estar relacionada ao metabolismo do RNA, atuando na regulação da tradução dos RNAm, na especificação e diferenciação de outros tipos de tecidos específicos (IKENISHI & TANAKA, 2000).

Em relação aos níveis relativos de expressão do *Rqvasa* nas gônadas, diferenças significativas foram encontradas entre os níveis de expressão nos ovários e nos testículos. *Rqvasa* foi mais expresso nos ovários do que nos testículos de *R. quelen*. Resultado similar também foi observado em *P. olivaceus* (Wu *et al.*, 2014). Nas gônadas, os sítios de expressão do vasa localizam-se nas células da linhagem germinativa, como reportado nos mais diversos organismos como, *D. melanogaster* (LASKO & ASHBURNER, 1988); zebrafish (YOON *et al.*, 1997), truta arco-íris (YOSHIZAKI *et al.*, 2000), tilápia (KOBAYASHI *et al.*, 2000), rã (IKENISHI *et al.*, 1996; KOMIYA *et al.*, 1994), galinha (TSUNEKAWA *et al.*, 2000). Em nosso estudo, também detectamos os transcritos primários do *Rqvasa* nas células da linhagem germinativa, sendo, portanto o *Rqvasa* um marcador específico de células germinativas em *R. quelen*.

Interessantemente, em ambas gônadas (ovários e testículos) de *R. quelen*, as células germinativas iniciais são as células que mais expressaram *vasa*, como também observado em outros teleósteos (BRAAT *et al.*, 2000; KNAUT *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2005). Nos testículos de *R. quelen*, o padrão de expressão do *vasa* foi maior nas espermatogônias iniciais, diminuindo sua expressão gradativamente ao longo do desenvolvimento das células germinativas. Não foi detectado expressão do *vasa* nos espermatozoides. Esse padrão também foi encontrado *A. japonicus* (YAN *et al.*, 2013) e *C. auratus gibelio* (XU *et al.*, 2005); neste último, além dos espermatozoides, as espermátides também não apresentaram expressão para o *vasa* (XU *et al.*, 2005). Já em *Oreochromis niloticus*, o RNAm do *vasa* foi detectado nas gerações espermatogonias e nos espermátócitos primários paquitênicos, não sendo encontrado em espermátócitos em diplóteno, espermátócitos secundários, espermátides e espermatozoides (KOBAYASHI *et al.*, 2000). Esta variação na expressão do *vasa* durante as diferentes gerações da linhagem germinativa masculina, poderia ser melhor compreendida se o papel do *vasa* na espermatogênese fosse conhecido, no entanto, pouco se conhece a respeito da sua função na espermatogênese. Em medaka, análises da dinâmica da proteína Vasa durante a espermatogênese sugerem que o Vasa tenha um papel importante na cito-diferenciação e formação do flagelo durante o processo da espermiogênese (YUAN *et al.*, 2014). Esta hipótese foi baseada na presença do Vasa como componente essencial do corpo cromatóide, que localiza-se na espermátide em forma de anel circundando o flagelo (YUAN *et al.*, 2014). Apesar de diversos estudos realizados em mamíferos, a função do corpo cromatóide ainda permanece indefinida. Porém, em camundongos, foi demonstrado que a perda da estrutura em forma de anel derivado do corpo de cromatóide, resulta em machos inférteis (SHANG *et al.*, 2010). Outros estudos mostram que camundongos deficientes para o gene homólogo do *vasa* (*Mvh*) possuem alterações na proliferação e diferenciação das CGPs, além do desenvolvimento anormal das células germinativas masculinas pré-meióticas, que resulta em morte apoptótica, gerando consequentemente machos estéreis (TANAKA *et al.*, 2000). Em zebrafish, a perda da função do gene *vasa* causou esterilidade em machos que tiveram testículos formados apenas por células de Sertoli (HARTUNG *et al.*, 2014). Interessantemente, para esses

mesmos organismos dos trabalhos acima, a deficiência do *vasa* teve efeito apenas na espermatogênese enquanto que a oogênese não sofreu alterações (SHANG *et al.*, 2010; TANAKA *et al.*, 2000; HARTUNG *et al.*, 2014).

Ao analisar os sítios de expressão de *Rqvasa* no ovário de *R. quelen*, observa-se que a distribuição celular do RNAm do *vasa* aparece de forma dinâmica ao longo do desenvolvimento oocitário, como reportado em *O. niloticus* (KOBAYASHI, *et al.*, 2000) e *A. japonicus* (YAN, *et al.*, 2013). Em *R. quelen*, oócitos perinucleolares expressaram fortemente *Rqvasa* no citoplasma, no núcleo, nos nucléolos e nos corpúsculos de Balbiani. Já no estágio pré-vitelogênico, *Rqvasa* se expressa uniformemente no citoplasma, diminuindo sua expressão no oócito vitelogênico, onde os transcritos do *vasa* se localizam no córtex celular. Esta distribuição é similar a encontrada em *L. calcarifer* (XU *et al.*, 2014). Já em *O. niloticus* (KOBAYASHI *et al.*, 2000) e *C. auratus gibelio*, (XU *et al.*, 2005) o RNAm do *vasa* não foi encontrado no núcleo da célula germinativa feminina em nenhum estágio, sendo presente somente no citoplasma. Em humanos (*Homo sapiens*) o *Vasa* foi detectável durante a fase fetal e nos ovários durante a infância e na fase púber em folículos primários (reserva), uma vez que este folículo entra em crescimento, o *Vasa* já não pode mais ser detectado (ALBAMNONTTE *et al.*, 2012). De um modo geral, esta variação na expressão do *vasa* ao longo do desenvolvimento das células germinativas femininas poderia estar associado processos de auto-renovação, diferenciação, e entrada em meiose (XU *et al.*, 2014). Em alguns organismos, este gene parece ser essencial. Por exemplo, em *D. melanogaster* que tiveram mutações em alelos que continham genes maternalmente herdados, dentre eles o *vasa*, não conseguiram completar a oogênese sendo, portanto, estéreis (SCHUPBACH & WIESCHAUS, 1991). Já em teleósteos, o *vasa* parece não ser essencial para o desenvolvimento das células germinativas femininas. Zebrafish fêmeas deficientes para *vasa* são férteis, não possuindo nenhuma alteração no desenvolvimento oocitário (HARTUNG *et al.*, 2014). De uma maneira geral, o papel do *vasa* na gametogênese ainda não está elucidado, mas os resultados obtidos em *R. quelen* indicam que o *vasa* desempenharia funções diferentes na oogênese e espermatogênese.

Ao avaliar a expressão do *Rqvasa* por RT-PCR e qRT-PCR durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen* foram encontrados níveis elevados de expressão deste gene no estágio de 0 hpf, sugerindo que o *vasa* presente neste estágio é de origem materna. Em geral, alguns fatores maternos (proteínas, RNAs) são depositados em estruturas denominadas como plasma germinativo, ou também corpúsculo de Balbiani, que são formadas durante a oogênese, e posteriormente localizadas em regiões específicas do embrião, os quais serão responsáveis pela especificação da linhagem germinativa (LASKO & SAFFMAN, 1999). Neste trabalho, também identificamos presença de transcritos primários do *vasa* nos corpúsculos de Balbiani nos oócitos perinucleolares. O corpúsculo de Balbiani é uma estrutura presente nas células germinativas femininas, e é composta por mitocôndrias, grânulos elétron-densos com complexos de RNAs/proteínas de longa duração (VORONINA *et al.*, 2011). Essa estrutura irá permanecer durante o desenvolvimento embrionário e será responsável por especificar as células germinativas primordiais como demonstrado em vários organismos e em alguns peixes teleósteos, como em medaka (*O. latipes*) (HERPIN *et al.*, 2007) e zebrafish (*D. rerio*) (HASHIMOTO *et al.*, 2004).

Sendo assim, vários estudos com outros teleósteos, também encontraram expressão elevada do *vasa* nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e atribuíram essa elevada expressão à presença de transcritos herdados maternalmente, como recentemente no salmão do Atlântico (NAGASAWA *et al.*, 2013). Em zebrafish, foi descoberto que a transcrição zigótica (do próprio embrião) tem início somente a partir da blástula medial (KANE & KIMMEL, 1993), portanto, o *Vasa* presente nos estágios iniciais é de origem materna (YOON, *et al.*, 1997).

Os níveis relativos de expressão do *vasa* diminuem significativamente e gradativamente após 0 hpf até atingir seu menor nível de expressão com 10 hpf (90% da epibolia completa). A partir deste estágio (10 hpf) até 264 hpf, os níveis de expressão de *Rqvasa* mantiveram-se estáveis. Interessantemente, o menor nível da expressão do *vasa* também foi observado no mesmo período do desenvolvimento embrionário (10 hpf) de *Japanese flounder* (WU *et al.*, 2014) *D.*

erio (WOLKE *et al.*, 2002), *G. carp* (XU *et al.*, 2005) e *C. gariepinus* (RAGHUVeer & SENTHILKUMARAN, 2010). A diminuição no nível da expressão do *vasa* pode ser explicada pela degradação dos transcritos maternos ou pela diluição do transcritos do *vasa* pelo aumento do número de células do indivíduo.

Os sítios de expressão do *Rqvasa* foram identificados através de técnicas de hibridização *in situ* em embrião inteiro. Desta forma, observamos que os transcritos primários de *Rqvasa* se expressam exclusivamente nas CGPs. Além disso, foi possível observar nos períodos avaliados (37, 43, 55, 72, 96 e 120 hpf), o processo migratório destas células em direção à região do primórdio gonadal. Sendo assim, no estágio de 10hpf (90% da epibolia completa), as CGPs estão presentes na região dorsal do embrião onde translocam-se do epiblasto em direção ao hipoblasto, semelhantemente ao encontrado em *Gymnogobius species* (SAITO *et al.*, 2004). No embrião com 19 hpf, em processo de somitogênese, as CGPs neste momento estão localizadas na mesoderme, associadas à camada sincicial do vitelo. A proximidade das CGPs com a camada sincicial do vitelo e com as células endodermais é comumente observada durante a migração destas células nos peixes teleósteos (NAGAI *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2002a; SAITO *et al.*, 2004). Nos estágios larvais mais avançados (37, 43, 55, 72, 96 e 120 hpf), as CGPs que expressam o *vasa* estão localizadas no mesentério dorsal no processo migratório em direção ao primordial gonadal. Esta descrição é semelhante ao observado em zebrafish que também utiliza o *vasa* como marcador molecular de CGPs (BRAAT, *et al.*, 1999). Neste estudo, a migração das CGPs foi identificada no estágio de cinco somitos, na periferia da endoderme, em contato com a camada sincicial do saco vitelínico, seguida de sua movimentação no mesentério dorsal até ao primordial gonadal, onde juntamente com as células mesenquimais irão estabelecer a gônada (BRAAT, *et al.*, 1999). Apesar da rota migratória das CGPs nos peixes ser bem conservada, algumas diferenças são notadas no padrão de migração como, por exemplo, a localização das CGPs na fase pré-somito, a distribuição lateral das CGPs no início da segmentação, assim como sua direção do movimento lateral para o eixo dorsal durante a segmentação e as posições finais destas células (SAITO *et al.*, 2006).

O presente trabalho mostrou de forma inédita a caracterização do cDNA homólogo do *vasa*, *Rqvasa*, em uma espécie nativa, *R. quelen*. Através da análise comparativa da sequência de aminoácidos com outros vertebrados e invertebrados, confirmou-se que o *vasa* é altamente conservado ao longo da evolução. Além disso, a análise da expressão do *Rqvasa* mostrou ser específico da linhagem germinativa. Diferenças no padrão de expressão durante gametogêneses de ambos os sexos, sugerem que o *Rqvasa* possa desempenhar papéis diferentes nestes processos. Já a análise de expressão durante o desenvolvimento embrionário e larval, permitiu observar a migração das CGPs. Tais informações básicas a respeito do *vasa* e da biologia das CGPs durante o desenvolvimento embrionário desta espécie nativa poderão ser úteis para estudos biotecnológicos. Dentre eles, o transplante das células tronco germinativas (espermatogônia ou oogônia) para a cavidade intraperitoneal das larvas recém-eclodidas, em que é importante saber o padrão migratório das CGPs para se estimar o período para realizar o transplante. Outra aplicação é utilizar o *vasa* como marcador molecular para isolar células germinativas indiferenciadas com base nos níveis de expressão do *vasa*. Desta forma, este trabalho inédito utilizando uma espécie nativa brasileira fornece resultados importantes para estudos biotecnológicos futuros utilizando-se *R. quelen* como modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- BLAZQUEZ, M.; GONZALEZ, A.; MYLONAS, C. C.; PIFERRER, F. Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 322-333, jan. 2011.
- BRAAT, A. K.; ZANDBERGEN, T.; VAN DE WATER, S.; GOOS, H. J. T.; ZIVKOVIC, D. Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. **Developmental Dynamics**, v. 216, n. 2, p. 153-167, out. 1999.
- BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11303-11307, nov. 1994.
- FILBY, A. L.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; TYLER, C. R. The *vas::egfp* transgenic zebrafish: A practical model for studies on the molecular mechanisms by which environmental estrogens affect gonadal sex differentiation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 602-605, mar. 2014.
- GRUIDL, M. E.; SMITH, P. A.; KUZNICKI, K. A.; MCCRONE, J. S.; KIRCHNER, J.; ROUSSELL, D. L.; STROME, S.; BENNETT, K. L. Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13837-13842, nov. 1996.
- HARTUNG, O.; FORBES, M. M.; MARLOW, F. L. Zebrafish Vasa is Required for Germ-Cell Differentiation and Maintenance. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 10, p. 946-961, out. 2014.
- HASHIMOTO, Y.; MAEGAWA, S.; NAGAI, T.; YAMAHA, E.; SUZUKI, H.; YASUDA, K.; INOUE, K. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. **Developmental Biology**, v. 268, n. 1, p. 152-161, abr. 2004.
- HAY, B.; ACKERMAN, L.; BARBEL, S.; JAN, L. Y.; JAN, Y. N. Identification of a component of drosophila polar granules. **Development**, v. 103, n. 4, p. 625-640, ago. 1988.
- HERPIN, A.; ROHR, S.; RIEDEL, D.; KLUEVER, N.; RAZ, E.; SCHARTL, M. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). **BMC Developmental Biology**, v. 7, n. 3, p. 1-10, jan. 2007.

- IKENISHI, K.; TANAKA, T. S. Spatio-temporal expression of *Xenopus vasa* homolog, XVLG1, in oocytes and embryos: The presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells. **Development Growth & Differentiation**, v. 42, n. 2, p. 95-103, abr. 2000.
- IKENISHI, K.; TANAKA, T. S.; KOMIYA, T. Spatio-temporal distribution of the protein of *Xenopus vasa* homologue (*Xenopus vasa*-like gene 1, XVLG1) in embryos. **Development Growth & Differentiation**, v. 38, n. 5, p. 527-535, out. 1996.
- ALBAMONTE, M. I.; ALBAMONTE, M. S.; STELLA, I.; ZUCCARDI, L.; VITULLO, A. D. The infant and pubertal human ovary: Balbianis body-associated VASA expression, immunohistochemical detection of apoptosis-related BCL2 and BAX proteins, and DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 698-706, mar. 2013.
- KANE, D. A.; KIMMEL, C. B. The zebrafish midblastula transition. **Development**, v. 119, n. 2, p. 447-456, out. 1993.
- KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Mechanisms of Development**, v. 99, n. 1-2, p. 139-142, dez. 2000.
- KROVEL, A. V.; OLSEN, L. C. Expression of a *vas::egfp* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. **Mechanisms of Development**, v. 116, n. 1-2, p. 141-150, ago. 2002.
- LACERDA, S. M. S. N.; BATLOUNI, S. R.; COSTA, G. M. J.; SEGATELLI, T. M.; QUIRINO, B. R.; QUEIROZ, B. M.; KALAPOTHAKIS, E.; FRANCA, L. R. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. **Plos One**, v. 5, n. 5, maio. 2010.
- LASKO, P. F.; ASHBURNER, M. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4a. **Nature**, v. 335, n. 6191, p. 611-617, out. 1988.
- MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Estimation of jundiá (*Rhamdia quelen*) dietary amino acid requirements based on muscle amino acid composition. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 4, p. 401-405, jul-ago. 2005.
- NAGAI, T.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Histological differentiation of primordial germ cells in zebrafish. **Zoological Science**, v. 18, n. 2, p. 215-223, mar. 2001.
- NAGASAWA, K.; FERNANDES, J. M. O.; YOSHIKAWA, G.; MIWA, M.; BABIAK, I. Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo*

- salar*. Characterization of Vasa, Dead End, and Lymphocyte antigen 75 genes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 2, p. 118-131, fev. 2013.
- NAKAMURA, A.; SEYDOUX, G. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development*, v. 135, n. 23, p. 3817-3827, dez. 2008.
- NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; DE FRANCA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. **Plos One**, v. 5, n. 9, set. 2010.
- OKUTSU, T.; SUZUKI, K.; TAKEUCHI, Y.; TAKEUCHI, T.; YOSHIZAKI, G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2725-2729, fev. 2006.
- OKUTSU, T.; YANO, A.; NAGASAWA, K.; SHIKINA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 6, p. 685-693, dez. 2006.
- PACCHIARINI, T.; CROSS, I.; LEITE, R. B.; GAVAIA, P.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; POUSAO-FERREIRA, P.; REBORDINOS, L.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. *Solea senegalensis* vasa transcripts: molecular characterisation, tissue distribution and developmental expression profiles. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, n. 4, p. 646-660, jul. 2013.
- PRESSLAUER, C.; NAGASAWA, K.; FERNANDES, J. M. O.; BABIAK, I. Expression of *vasa* and *nanos3* during primordial germ cell formation and migration in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1262-1277, out. 2012.
- RAGHUVeer, K.; SENTHILKUMARAN, B. Cloning and differential expression pattern of vasa in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 157, n. 1, p. 79-85, set. 2010.
- RAZ, E. Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 9, p. 690-700, set. 2003.
- ROCAK, S. e LINDER, P. Dead-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 3, p. 232-241, mar. 2004.
- SAFFMAN, E. E. e LASKO, P. Germline development in vertebrates and invertebrates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 8-9, p. 1141-1163, jul. 1999.

- SAITO, T.; FUJIMOTO, T.; MAEGAWA, S.; INOUE, K.; TANAKA, M.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3' UTR mRNA. **International Journal of Developmental Biology**, v. 50, n. 8, p. 691-700, 2006.
- SAITO, T.; OTANI, S.; FUJIMOTO, T.; SUZUKI, T.; NAKATSUJI, T.; ARAI, K.; YAMAHA, E. The germ line lineage in ukigori, *Gymnogobius species* (Teleostei : Gobiidae) during embryonic development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 10, p. 1079-1085, dez. 2004.
- SAITO, T.; OTANI, S.; NAGAI, T.; NAKATSUJI, T.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Germ cell lineage from a single blastomere at 8-cell stage in shiro-uo (ice goby). **Zoological Science**, v. 19, n. 9, p. 1027-1032, set. 2002.
- SCHUPBACH, T.; WIESCHAUS, E. Female sterile mutations on the 2nd chromosome of *Drosophila-melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. **Genetics**, v. 129, n. 4, p. 1119-1136, dez. 1991.
- SHANG, P.; BAAREND, W. M.; HOOGERBRUGGE, J.; OOMS, M. P.; VAN CAPPELLEN, W. A.; DE JONG, A. A. W.; DOHLE, G. R.; VAN EENENNAAM, H.; GOSSEN, J. A.; GROOTEGOEDE, J. A. Functional transformation of the chromatoid body in mouse spermatids requires testis-specific serine/threonine kinases. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 3, p. 331-339, fev. 2010.
- SILFVERGRIP, A. M. C. A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). 1996.
- TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1142-1149, out. 2003.
- TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Surrogate broodstock produces salmonids. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 629-630, ago. 2004.
- TANAKA, S. S.; TOYOOKA, Y.; AKASU, R.; KATOH-FUKUI, Y.; NAKAHARA, Y.; SUZUKI, R.; YOKOYAMA, M.; NOCE, T. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. **Genes & Development**, v. 14, n. 7, p. 841-853, abr. 2000.
- THISSE, C.; THISSE, B. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. **Nat. Protocols**, v. 3, n. 1, p. 59-69, 2008.
- TSUNEKAWA, N.; NAITO, M.; SAKAI, Y.; NISHIDA, T.; NOCE, T. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. **Development**, v. 127, n. 12, p. 2741-2750, jun. 2000.

- VORONINA, E.; SEYDOUX, G.; SASSONE-CORSI, P.; NAGAMORI, I. RNA Granules in Germ Cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, dez. 2011.
- WEIDINGER, G.; WOLKE, U.; KOPRUNNER, M.; KLINGER, M.; RAZ, E. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. **Development**, v. 126, n. 23, p. 5295-5307, dez. 1999.
- WOLKE, U.; WEIDINGER, G.; KOPRUNNER, M.; RAZ, E. Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish. **Current Biology**, v. 12, n. 4, p. 289-294, fev. 2002.
- WU, X.; WANG, Z.; JIANG, J.; GAO, J.; WANG, J.; ZHOU, X.; ZHANG, Q. Cloning, expression promoter analysis of vasa gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 167, p. 41-50, jan. 2014.
- XU, H. Y.; GUI, J. F.; HONG, Y. H. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 3, p. 872-882, jul. 2005.
- XU, H.; LIM, M.; DWARAKANATH, M.; HONG, Y. Vasa Identifies Germ Cells and Critical Stages of Oogenesis in the Asian Seabass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 225-235, 2014.
- YAN, M.; SUI, J.; SHENG, W.; SHAO, M.; ZHANG, Z. Expression pattern of vasa in gonads of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during gametogenesis and reproductive cycle. **Gene Expression Patterns**, v. 13, n. 5-6, p. 171-176, jun-jul. 2013.
- YOON, C.; KAWAKAMI, K.; HOPKINS, N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development**, v. 124, n. 16, p. 3157-3165, ago. 1997.
- YOSHIZAKI, G.; OKUTSU, T.; MORITA, T.; TERASAWA, M.; YAZAWA, R.; TAKEUCHI, Y. Biological Characteristics of Fish Germ Cells and their Application to Developmental Biotechnology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 187-192, ago. 2012.
- YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, Y.; SAKATANI, S.; TAKEUCHI, T. Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. **International Journal of Developmental Biology**, v. 44, n. 3, p. 323-326, abr. 2000.

YUAN, Y.; LI, M.; HONG, Y. Light and electron microscopic analyses of Vasa expression in adult germ cells of the fish medaka. **Gene**, v. 545, n. 1, p. 15-22, jul. 2014.

CONCLUSÃO GERAL

Nossos estudos permitem concluir que:

- O cDNA completo de *Rqvasa* constitui-se de 2016 pares de bases, que codifica uma proteína de 671 aminoácidos. A proteína Vasa é formada por oito domínios distribuídos nas duas superfamílias da Helicase C e DEAD. Estas análises mostram que o gene/proteína é conservado dentro das espécies de peixes teleósteos.
- Análises evolutivas para a proteína codificada pelo gene *vasa*, demonstraram que *R. quelen*, *C. gariepinus* e *S. meridionalis*, são evolutivamente próximos, confirmando a homologia do gene.
- A análise da expressão em tecidos/órgãos, revelou que o *Rqvasa* é restrito às gônadas. Os sítios de expressão foram identificados mostrando que o *Rqvasa* está presente nas células da linhagem germinativa feminina e masculina.
- A análise espaço-temporal da expressão do durante o desenvolvimento embrionário e larval de *R. quelen* mostrou que o transcrito primário do *Rqvasa* estavam presentes desde o zigoto, indicando herança materna do mesmo. A expressão do gene diminuiu ao longo do desenvolvimento embrionário permanecendo constante durante o período larval estudado. Os sítios de expressão foram detectados nas células germinativas primordiais em seu processo migratório em direção ao primórdio gonadal.
- O *vasa* pode ser utilizado como um marcador específico para a linhagem germinativa em *R. quelen*.