David dos Santos Soares

Padrões de localização celular de proteínas da linhagem germinativa em tunicados solitários e coloniais

Patterns of cellular localization of germline proteins in solitary and colonial tunicates

São Paulo

2019

David dos Santos Soares

Padrões de localização celular de proteínas da linhagem germinativa em tunicados solitários e coloniais

Patterns of cellular localization of germline proteins in solitary and colonial tunicates

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Zoologia.

São Paulo

2019

Ficha catalográfica

Santos-Soares, David
Padrões de localização celular de proteínas da linhagem germinativa em tunicados solitários e coloniais : Patterns of cellular localization of germline proteins in solitary and colonial tunicates / David Santos Soares ; orientador Federico David Brown . -- São Paulo, 2019.

61 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Zoologia.

1. tunicado. 2. solitário. 3. colonial. 4. somático. 5. germinativo. I. Brown , Federico David, orient. II. Título.

Comissão julgadora

`

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

`

Prof. Dr.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao Professor Federico David Brown Almeida por ter me concedido a oportunidade de vir trabalhar em seu laboratório. Agradeço por ter me ensinado a fazer ciência, mas acima de tudo agradeço por sua humildade, uma vez que graças à você pude sair de uma favela de Santo André – SP e me tornar a primeira e única pessoa de minha família a ter acesso a um programa de pós-graduação, bem como realizar meu sonho pessoal de ser pesquisador na área de ciências biológicas. Sua humildade é muito bem vinda num meio tão competitivo e egocêntrico que é o campo científico brasileiro. Embora não seja um ser humano perfeito, a leveza com a qual você administra o ambiente de trabalho é o que te torna um verdadeiro líder e bom orientador.

Agradeço à todos os funcionários do Instituto de Biociências que de alguma forma contribuíram para este trabalho, seja me auxiliando na utilização de algum equipamento, seja na limpeza do chão dos corredores.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório, por sua disponibilidade em ajudar-me nas diferentes etapas de elaboração deste trabalho, seja ensinando um procedimento experimental, seja me tranquilizando nos momentos de angústia. Agradeço também à Gabriela Agurto Rodríguez não só pelo conhecimento sobre taxonomia que me transmitiu, mas também por sua amizade e companheirismo.

Agradeço ao meu colaborador Thiago Giove Mitsugi, que desde o início se prontificou, muito gentilmente, a me ajudar na realização da técnica de western blot, contribuindo para a geração de dados fundamentais para minha pesquisa.

Agradeço ainda algumas pessoas que me acompanharam nestes últimos meses/anos cuja importância não é possível descrever em palavras: Felipe Moraes da Silva Lima, Lucas Jorge Martins Rahyn, André Vinicius Nunes e Gabriel Galdino.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (2017/13758-0), fundamental não só para realização deste projeto, mas também para que eu pudesse mudar de vida. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização de recursos via Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

Índice

Introdução geral.....1

Capítulo 1: Localização de proteínas de linhagem primordial germinativa em tunicados solitários e coloniais da família Styelidae e avaliação de anticorpos gerados em tunicados como possíveis marcadores da linhagem germinativa.....5

Capítulo 2: Localização celular da proteína YB1 na gametogênese em tunicados solitários e coloniais do clado Styelidae.....31

Discussão geral e conclusões.....49

Resumo (geral).....52

Abstract.....53

Introdução geral

Em organismos metazoários podem ser observados dois grupos diferentes de células que irão divergir muito em relação aos seus destinos e nas suas conseqüências evolutivas: células somáticas e células germinativas. O primeiro grupo corresponde à todas as células diplóides do corpo, que se dividirão apenas via mitose e que não estão diretamente envolvidas no processo de reprodução sexuada e o segundo diz respeito à células única e exclusivamente comprometidas com o processo de reprodução sexuada, de modo que tais células, em última instância, darão origem aos ovócitos e espermatozóides, estes últimos sendo originados via mitose e meiose (NIEUWKOOP & SUTASURIA, 1981). Essa divisão entre células somáticas e germinativas é observada na grande maioria dos animais, porém em alguns organismos que apresentam altas capacidades regenerativas e/ou capacidade de reprodução assexuada (SOLANA, 2013), pode ser difícil determinar se alguns tipos celulares correspondem a células somáticas ou germinativas. Organismos tais como cnidários, platelmintos e tunicados apresentam células-tronco primordiais que estão envolvidas nos processos de regeneração somática e/ou fissão (reprodição assexuada), mas também na reprodução sexuada (SOLANA, 2013). As células-tronco primordiais podem ser definidas como um grupo de células pluripotentes que possuem potencial germinativo e somático (SOLANA, 2013). Elas são caracterizadas pela presença de grânulos citoplasmáticos e expressam proteínas tais como Vasa, Piwi, PL10, Nanos, Tudor, proteínas da família Y-Box (TANAKA et al., 2004; ROSNER , PAZ & RINKEVICH, 2006; SOLANA, 2013); além de componentes maternos herdados desde o zigoto que apresentam a maquinaria (proteínas e mRNAs) cujas funções incluem: fornecer a energia necessária para controle dos estágios iniciais da embriogênese (SOLANA, 2013). O presente trabalho se foca no estudo das células-tronco primordiais germinativas de organismos tunicados e que são denominadas hemoblastos.

Os tunicados são um subgrupo dos cordados (filo Chordata, subfilo Tunicata), com pouco menos de 3100 espécies descritas (SHENKAR et al., 2019). Os tunicados são organismos exclusivamente marinhos e podem ser divididos em três grupos monofiléticos que se distinguem pela morfologia e modo de vida (DELSUC et al., 2018; KOCOT et al., 2018): o primeiro é denominado Appendicularia ou Larvacea e apresenta poucas espécies, são exclusivamente pelágicos e solitários, conservam os caracteres típicos dos cordados durante toda a vida num processo denominado pedomorfose além de apresentarem uma das taxas de evolução do genoma mais rápidas entre todos os metazoários; o segundo é

composto pelo clado denominado Thaliacea + Phlebobranchia e Aplousobranchia, o primeiro composto por espécies coloniais pelágicas, enquanto os outros dois grupos apresentam espécies bentônicas, solitárias ou coloniais; e por fim o grupo irmão do clado anterior corresponde às ascídias Stolidobranchia, também composto por espécies bentônicas, solitárias ou coloniais (DELSUC et al., 2018; KOCOT et al., 2018). Stolidobranchia, Aplousobranchia e Phlebobranchia formaram, por muito tempo, o grupo parafilético Ascidiacea, que correspondia ao grupo com maior número de espécies dentre Tunicata; apesar disso, análises moleculares recentes utilizando dados de transcriptomas mostram que Ascidiacea é um grupo parafilético, uma vez que Thaliacea possui um ancestral em comum com as ascídias Plebobranchia e Aplousobranchia (DELSUC et al., 2018; KOCOT et al., 2018).

Tunicata é um grupo constituído tanto por formas coloniais quanto solitárias que diferem em vários aspectos reprodutivos. As espécies solitárias se reproduzem apenas sexualmente; nestes organismos que são hermafroditas, os gametas são liberados na coluna de água, de modo que a fertilização é externa; o zigoto apresenta um desenvolvimento em mosaico (atípico para um deuterostômio) e se desenvolve rapidamente numa larva que após um curto período de dispersão na coluna de água se fixa a um substrato (no caso dos tunicados sésseis) e inicia o processo de metamorfose (KASAS, 1940). Os tunicados coloniais se reproduzem sexualmente de um modo similar ao descrito para as solitárias, mas também apresentam reprodução assexuada por brotamento. Dentro de Tunicata observamos clados com formas solitárias e coloniais em que a condição ancestral de ambos não pode ser inferida pela falta de filogenias completas e bem resolvidas. Entretanto, nossos estudos em biologia evolutiva do desenvolvimento e em sistemática filogenética se concentram nas ascídias da família Styelidae, uma vez que neste grupo, existem espécies solitárias e coloniais cujos dados moleculares e morfológicos mostram que as atuais espécies coloniais descendem de um ancestral solitário (ALIÉ et al., 2017). As ascídias coloniais da família Styelidae, especialmente aquelas do clado formado por *Botryllus* + *Symplegma* se diferenciam das solitárias desta família por apresentar um plano corpóreo constituído por várias unidades geneticamente idênticas (zoóides) e fisicamente conectados por um sistema circulatório comum, capacidade de reprodução assexuada por brotamento, miniaturização do corpo e larvas que eclodem mais desenvolvidas em relação às larvas das espécies solitárias ou pelo

menos com primórdios dos órgãos adultos maiores e mais desenvolvidos, um fenômeno chamado adultamento (KASAS, 1940).

A característica mais importante das ascídias coloniais da família Styelidae é a presença de células celômicas indiferenciadas denominadas hemoblastos, com aproximadamente 5 micrômetros em diâmetro, um núcleo grande com um nucléolo evidente e poucas organelas; embora os hemoblastos também existam em ascídias solitárias, eles parecem exercer funções diferentes em ascídias solitárias e coloniais, pois nestas últimas os hemoblastos estão diretamente relacionados com o processo de brotamento (SUNANAGA, INUBUSHI & KAWAMURA, 2010), regeneração de corpo inteiro, (BROWN et al., 2009b) e com a formação das gônadas nos zoóides (LANGERBACHER & De TOMASO, 2016), portanto estas células estão diretamente relacionadas ao processo de reprodução assexuada nestes organismos. Em *Botryllus schlosseri,* as colônias apresentam hemoblastos que dão origem a células/tecidos somáticos (hemoblastos somáticos) e à células primordiais germinativas (hemoblastos da linhagem germinativa) (KAWAMURA & SUNANAGA, 2010; BROWN et al 2009b). Os hemoblastos da ascídia colonial *Perophora viridis* correspondem a células-tronco primordiais, do mesmo modo que os neoblastos das planárias e as células intersticiais dos cnidários também o são (SOLANA, 2013). O potencial de diferenciação e níveis de comprometimento dos hemoblastos em distintas espécies de ascídias coloniais permanece uma questão em aberto.

Nos zoóides de *Botryllus schlosseri* com gônadas, células tronco germinativas se desprendem das mesmas, caem na circulação sanguínea e se deslocam para o broto em desenvolvimento, onde contribuirão para a formação das gônadas hermafroditas (KASSMER et al, 2015; LANGERBACHER & De TOMASO, 2016), permitindo assim que cada unidade da colônia tenha capacidade de reprodução sexuada e assexuada (SUNANAGA, INUBUSHI & KAWAMURA, 2010); isso é importante pois organismos que se propagam assexuadamente precisam reconstruir suas gônadas a cada nova geração (SUNANAGA, INUBUSHI & KAWAMURA, 2010). Existe na literatura um grande número de estudos dedicados a entender o desenvolvimento das ascídias coloniais da família Styelidae (*Botryllus* sp. e *Botrylloides* spp.) especialmente os fenômenos morfológicos e moleculares por trás do brotamento e os perfis de expressão e/ou localização celular e subcelular de proteínas das células tronco da linhagem primordial germinativa (ROSNER, PAZ & RINKEVICH, 2006; ROSNER et al., 2009; BROWN et al., 2009a; BROWN et al., 2009b; RINKEVICH et al., 2010; SUNANAGA, INUBUCHI & KAWAMURA, 2010;

KAWAMURA & SUNANAGA, 2011; LANGUERBACHER & DE TOMASO, 2016). Apesar disso, carecem na literatura estudos focados nos hemoblastos das ascídias solitárias da família Styelidae (*Styela* sp.). As ascídias solitárias se reproduzem apenas sexualmente, e embora apresentem hemoblastos em sua corrente sanguínea, não é esperado que os mesmo participem da gametogênese ou qualquer outro processo direta ou indiretamente relacionado à reprodução. Se as atuais espécies coloniais da família Styelidae descendem de um ancestral solitário, isso significa que em algum momento um organismo semelhante às atuais solitárias desta família, adquiriram a capacidade de se reproduzir assexuadamente por brotamento, além das outras características das coloniais já citadas. Deste modo, é importante que estudos também sejam direcionados nos hemoblastos para as formas solitárias, que se assemelham mais à condição ancestral das atuais coloniais.

Capítulo 1

Avaliação de especificidade de anticorpos gerados em tunicados como possíveis marcadores da linhagem germinativa em ascídias solitárias e coloniais do clado Styelidae

David dos Santos Soares[1,2], Thiago Giove Mitsugi[3]; Federico D. Brown[1,2]

1 – Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

2 – Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMAR), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

3 – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo

Organismos coloniais do subfilo Tunicata são os únicos cordados com capacidade de reprodução assexuada e regeneração de corpo inteiro fazendo com que estes organismos sejam de grande interesse para a biologia evolutiva do desenvolvimento. As ascídias da família Styelidae apresentam ao menos dois eventos de evolução da colonialidade a partir de um ancestral solitário. Utilizando a ascídia *Styela canopus* como modelo solitário e *Symplegma rubra* como modelo colonial, primeiramente avaliou-se a especificidade de anticorpos gerados em outras espécies de tunicados nas espécies modelo aqui utilizadas e após a validação dos anticorpos a localização das proteínas de linhagem germinativa Vasa, Piwi, PL10 e Y-box foi investigada a nível celular por meio de western blot, imunohistoquímica e microscopia confocal tanto em tecidos somáticos quanto germinativos. Os resultados de imunohistoquímica mostram que todas as proteínas estudadas se localizam nos oócitos e/ou testículos tanto na ascídia solitária quanto na colonial além de estar nos hemoblastos da vasculatura da colonial *S. rubra*, de acordo com resultados previamente descritos na literatura para outras espécies de tunicados. Inesperadamente, observou-se células sanguíneas positivas para Vasa e Piwi na hemocele da ascídia solitária *S. canopus*. O anticorpo gerado para reconhecer Piwi de *Botrylloides leachi* apresentou uma marcação pouco consistente em tecidos somáticos da solitária *Styela canopus*, demonstrando inespecificidade; os resultados obtidos através de western blot de diferentes tecidos também sugerem inespecificidade do anticorpo BL-Piwi. A presença destas proteínas de linhagem germinativa em outros tipos celulares fora das gônadas da ascídia solitária, permite supor que: (1) as células positivas podem representar tipos celulares indiferenciados (relacionados a GSCs) envolvidos em outros processos do desenvolvimento (por exemplo, regeneração) ou (2) essas proteínas que se expressam em GSCs adquiriram funções em células somáticas em *S. canopus* que permanecem desconhecidas. Apesar disso, devido à inespecificidade de alguns anticorpos não é possível afirmar categoricamente que a solitária apresente células indiferenciadas na

hemocele que expressam proteínas de linhagem germinativa tal como observado nas coloniais.

Palavras-chave: proteínas da linhagem primordial germinativa, ascídias da família Styelidae, ascídias solitárias e coloniais

Abstract

Colonial organisms of the Tunicata are the only chordates with both sexual and asexual reproduction and whole body regeneration capacity making these organisms of great interest to evolutionary developmental biology. In the Styelidae the ancestor is solitary, and we find at least two events of coloniality. In this study, we tested germline antibodies generated in other tunicate species for two local styelid species, i.e. the solitary ascidian *Styela canopus* and the colonial *Symplegma rubra*. We validated these antibodies by the observing the signal location of germline proteins Vasa, Piwi, PL10 and Y-box, by immunohistochemistry and confocal microscopy, as well as by evaluating protein sizes by western blot. The results of immunohistochemistry showed that all the proteins were located in oocytes or testes in both solitary and colonial ascidians, as well as in the hemoblasts in the vasculature of colonial *S. rubra.* Unexpectedly, Vasa and Piwi positive blood cells were also observed in cells in the hemocoel of solitary *S. canopus*. However, the *Botrylloides leachi* Piwi showed inconsistent results across immunohistochemistry replicates in somatic tissues of the solitary *S. canop*us, and western blot results from different tissues showed multiple banding patterns suggesting that the antibody was non-specific. Whereas, the presence of germline proteins Vasa, PL10, and Y-box in cells of the hemocoel -outside the gonads- in *S. canopus* suggests the presence of putative circulatory stem cells in solitary species that may be functionally related to stem cells of colonial species. Whether these cells are involved in regeneration or other developmental processes remains unknown. Nevertheless, nonspecific labeling of the antibodies, with the exception of CiYB1, does not allow me to identify the specific cells of the hemocoel expressing Vasa and PL10, or categorically conclude that solitary species have undifferentiated cells that express these markers in the hemocoel as reported in germline or somatic stem cells of colonial styelids.

Key words: germline proteins, styelid ascidians, solitary, colonial

Introdução

As células da linhagem primordial germinativa (PGCs) podem ser definidas como as células precursoras que originarão, em última instância, oócitos e espermatozóides. As PGCs se desenvolvem durante a embriogênese entre a fase embrionária até a migração e residência nas gônadas no organismo adulto onde finalmente darão origem às células-tronco germinativas (GSCs). Tunicados coloniais da família Styelidae são de grande interesse para a biologia do desenvolvimento porque nestes organismos, tais células encontram-se não apenas nas gônadas dos organismos adultos como também em células fora das gônadas (BROWN & SWALLA, 2007). Proteínas tais como Vasa, Piwi, PL10 e Y-Box tem sido utilizadas na literatura como marcadores de linhagem primordial em tunicados do clado Styelidae (ROSNER et al., 2009; TANAKA et al., 2004).

Vasa é uma proteína do tipo helicase de RNA dependente de ATP que apresenta homólogos conservados em muitos organismos metazoários e que tem sido utilizada como marcador de células da linhagem germinativa (GUSTAFSON & WESSEL, 2010); mesmo organismos distantes evolutivamente e com modos de reprodução diferentes apresentam homólogos de Vasa, de modo que ela demonstra ser uma proteína fundamental na manutenção e funcionamento das células da linhagem primordial germinativa assim como nas espermatogônias e oogônias (GUSTAFSON & WESSEL, 2010), que representam as células tronco germinativas dos testículos e ovários, respectivamente. Vasa pertence à família DEAD box que é caracterizada pela presença de nove aminoácidos repetidos em sequência (os chamados “motifs”) e que provavelmente estão relacionados à característica principal da proteína de interação com RNAs (GUSTAFSON & WESSEL, 2010). Diversos trabalhos na literatura tem se dedicado a estudar os padrões de expressão, localização e funções de homólogos de Vasa nos organismos do subfilo Tunicata, principalmente nos organismos-modelo *Ciona* spp. e *Botryllus schlosseri* (FUJIMURA & TAKAMURA, 2000; SHIRAE-KURABAYASHI et al., 2006; BROWN & SWALLA, 2007; BROWN et al., 2009; ROSNER et al., 2009; KAWAMURA & SUNANAGA, 2011; KASSMER et al., 2015; LAMGERBACHER & De TOMASO, 2016).

Piwi representa uma ampla classe de proteínas que estão relacionadas à biogênese e manutenção de pequenos RNAs-não codificantes e tem sido utilizado como marcador de células-tronco da linhagem germinativa; estas proteínas desempenham funções durante o desenvolvimento de células primordiais germinativas e também na gametogênese (THOMSON & LIN, 2009).

Por outro lado, BS-PL10 é uma proteína de *Botryllus schllosseri* homóloga à proteína DDX3 e DDX3Y expressa em seres humanos e paráloga à helicase de RNAs amplamente utilizada como marcador de linhagem germinativa conhecida como Vasa. PL10 faz parte de uma classe de proteínas com funções diferentes de acordo com o organismo em questão (controle do *splicing*, controle da síntese e degradação de RNAs, transporte de mRNAs, entre outros) mas, de um modo geral sua função é controlar o processo de diferenciação celular nas células germinativas (ROSNER , PAZ & RINKEVICH, 2006; MILANI et al., 2017).

As proteínas da família Y-box constituem um grupo muito conservado de proteínas com alta afinidade de ligação a ácidos nucléicos que apresentam uma série de domínios específicos deste tipo de proteína, cuja característica marcante é a presença de domínios ácidos e básicos posicionados de forma alternada (WOLFFE, 1994). Tanaka e colaboradores (2004) mostraram que existem ao menos três proteínas da família Y-box em *Ciona* (CiYB1, CiYB2 e CiBY3) e que CiYB1 está associada com mRNAs nas gônadas e no embrião, apresentando funções de estabilização temporal e espacial dos mRNAs, atuando portanto no controle da tradução.

O presente trabalho hipotetiza que as proteínas da linhagem germinativa de ascídias solitárias da família Styelidae localizam-se apenas nas células germinativas das gônadas. Assim é interessante entender como a linhagem germinativa se comporta em duas espécies próximas evolutivamente (da mesma família), mas com modos reprodutivos diferentes. No que tange ao estudo da evolução da colonialidade em Styelidae, carecem na literatura trabalhos utilizando tunicados solitários para compreender tais aquisições e a grande maioria dos trabalhos utiliza apenas uma ou duas proteínas como marcadores; no sentido de preencher esta lacuna, este trabalho utiliza como modelo principal de estudo a ascídia solitária *Styela canopus* e a ascídia colonial *Symplegma rubra* e para entender melhor onde se localizam as células da linhagem germinativa utilizamos quatro anticorpos para marcar proteínas de linhagem germinativa específicas de tunicados.

Os anticorpos BS-Vasa, BL-Piwi e BS-PL10 foram produzidos com objetivo de reconhecer especificamente proteínas da linhagem germinativa em tunicados coloniais do clado Botrillinae; CiYB1 por sua vez foi produzido para reconhecer especificamente uma proteína Y- box da ascídia phlebobranchia solitária *Ciona* SP (TANAKA et al., 2004). Embora sejam relatados na literatura como marcadores de linhagem germinativa em tunicados, Vasa, Piwi, PL10 e Y-box representam proteínas com funções diferentes e cujos

padrões de expressão e localização celular ainda não são completamente entendidos nos organismos deste subfilo. No sentido de preencher essa lacuna, o presente trabalho propôs uma abordagem holística, testando todos estes marcadores em tunicados solitários e coloniais que embora possuam histórias de vida diferentes, pertencem ao mesmo clado monofilético, interpretando os resultados com vistas para a melhor compreensão da evolução da colonialidade que ocorreu neste clado a partir de um ancestral solitário.

Objetivo

Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo comparar a localização celular de proteínas da linhagem germinativa em tunicados solitários e coloniais do clado Styelidae

Objetivos específicos

- Avaliar a especificidade dos anticorpos BS-Vasa, BS-PL10, BL-Piwi e CiBY gerados em *Botryllus schlosseri*, *Botrylloides leachi* e *Ciona intestinalis*, respectivamente, nas espécies *Styela canopus* (solitária) e *Symplegma rubra* (colonial) do clado monofilético Styelidae
- Uma vez atestada a especificidade, discutir as diferenças nos padrões de localização dessas proteínas nas espécies solitária e colonial**,** com ênfase nas proteínas Vasa e PL10 (Nota: embora esses anticorpos tenham reconhecido proteínas de tamanhos diferentes no western blot, pelo menos uma proteína corresponde a um ortólogo do tamanho previsto) e como as diferenças nestes padrões se relacionam com os modos de vida solitário e colonial.

Materiais e Métodos

Coleta e manutenção dos animais

Espécimes de ascídias solitárias (*Styela canopus*) e coloniais (*Symplegma rubra*) foram coletados no Yacht Club de Ilhabela, no litoral do estado de São Paulo, Brasil (coordenadas:

23° 46’ 20” S. 45° 21’ 20”). As ascídias solitárias foram coletadas manualmente de subtratos artificias como bóias e cordas; as coloniais foram coletadas da parede do píer (0-2 metros de profundidade) e outros substratos duros com o auxílio de uma faca, cortadas em quadrados de aproximadamente 1 cm X 1 cm e atadas com linha à lâminas de vidro de microscopia, que foram amarradas ao píer e retornadas ao mar a fim de permitir que a colônia se replicasse e crescesse ao longo das lâminas, que após três semanas foram retiradas do mar e levadas aos aquários do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde foram prontamente fixadas para histologia.

Coleta de células sanguíneas

No sentido de obter células do sangue para fins de análise morfológica e também para western blot, indivíduos de *S. canopus* tiveram seus sifões cortados e o sangue foi coletado em tubos que foram centrifugados a 15000 rpm durante 5 minutos e congelados a - 80 °C até o momento do western blot. Para a coleta das células sanguíneas das coloniais, os espécimes foram limpos e imersos numa solução anticoagulante seguindo o protocolo de Ballarín & Cima (2005), o sangue foi coletado em tubos por meio de cortes nas âmpolas, depois o sangue coletado foi centrifugado e congelados da mesma forma como foi realizado com as células sanguíneas da ascídia solitária.

Western Blot

Com o objetivo atestar a especificidade dos anticorpos e verificar a presença das proteínas da linhagem primordial germinativa nas gônadas e também em tecidos somáticos (apenas) da espécie solitária *S. canopus*, foram dissecados espécimes para obtenção de gônadas, intestino, manto (da região dos sifões), além de um espécime que foi utilizado inteiro como controle e do sangue cujo procedimento de coleta foi anteriormente descrito. Cada um destes tecidos foram armazenados em microtubos de 1,5 ml a - 80° C até o momento da extração de proteínas. Para a extração, os tecidos foram descongelados e aos mesmos adicionou-se o tampão de extração RIPA de acordo com a quantidade de tecido. Os tecidos juntamente com o tampão de extração foram macerados no próprio tubo, aquecidos a 60°C e sonicados a fim de melhorar a qualidade da extração; os extratos de proteína foram centrifugados a 15000 G a 4° por 15 minutos; ao sobrenadante adicionou-

se corante Ponceau para verificar a qualidade da transferência após eletroforese. O gel de poliacrilamida foi imerso em tampão de corrida e submetido à eletroforese e as proteínas já separadas em suas respectivas bandas foram transferidas para membrana de celulose. A membrana foi bloqueada numa solução de PBST + leite a 4 % durante 2 horas, depois adicionou-se os anticorpos primários anteriormente mencionados numa solução de PBST + leite a 5% na concentração de 1:500 conforme realizado por Tanaka e colaboradores (2004), Rosner, Paz & Rinkevich (2006), Rosner e colaboradores (2009) e Rinkevich e colaboradores (2010) durante 12 horas. Secundariamente, também testou-se anticorpos comerciais específicos para células-tronco/hematopoiéticas: CD29, CD45, CD117, CD133 e F4/80. Após incubação, as membranas foram lavadas com PBST (3 lavagens de 10 minutos cada) e foi adicionado o anticorpo secundário durante 2 horas. Por fim, realizaram-se mais 3 lavagens de PBST de 10 minutos cada, e adicionou-se substrato para reação de quimiolumescência e posterior revelação da membrana.

Histologia

Anteriormente ao início do procedimento de histologia, os animais foram limpos externamente para remoção do excesso de material orgânico, epibiontes e algas e mantidos durante 12 horas em água marinha filtrada para a remoção do conteúdo intestinal, a fim de reduzir a presença de artefatos nos cortes histológicos bem como a autofluorescência indesejável gerada em parte por algas unicelulares. Os animais foram fixados numa solução de água marinha filtrada com 4% de formaldeído, depois foram serialmente imersos em soluções de água marinha filtrada com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70% e 95%) durante 30 minutos cada, depois imersos em etanol 100% durante 2 horas para completa desidratação, em seguida em xileno 100% durante 1 hora, xileno 100% durante 1 hora a 60°C, xileno + parafina em iguais concentrações durante 1 hora a 60°C, depois em parafina a 100% a 60° C durante 24 horas. Posteriormente os animais foram emblocados e cortados em secções de 5 µm com micrótomo e aderidos em lâminas de microscopia com albumina + glicerina para auxiliar na aderência dos tecidos à lâmina e por fim foram armazenados em caixas de histologia à temperatura ambiente. Para reidratação dos cortes foi realizado todo o processo ao inverso: as lâminas foram mantidos em estufa a 60°C por pelo menos 30 minutos, depois foram imersas em xileno 100% durante 10 minutos, etanol 100% durante 10 minutos, serialmente imersos em soluções de água marinha filtrada com concentrações decrescentes de etanol

(95%, 70%, 50% e 30%) durante 5 minutos cada e por fim em água destilada por 5 minutos. Para fins de análise morfológica, os tecidos foram em seguida corados com corante Azul de Alcian e analisados por microscopia de campo claro.

Imunohistoquímica

Para testar a especificidade dos anticorpos bem como verificar os padrões de localização de proteínas supostamente específicas de células da linhagem primordial germinativa, cortes de ambos espécimes, *S. canopus* (ascídia solitária) e *S. rubra* (ascídia colonial) foram reidratados, lavados com PBS (3 lavagens de 10 minutos cada), bloqueados numa solução de PBT + leite em pó a 5 % durante 2 horas e depois adicionou-se os anticorpos primários (Anti-BSVasa, Anti-BSPiwi, Anti-BSPL10 e Anti-CiBY1, todos produzidos em coelho) diluídos em PBT em concentração de 1:500 conforme realizado por Tanaka e colaboradores (2004), Rosner, Paz & Rinkevich (2006), Rosner e colaboradores (2009) e Rinkevich e colaboradores (2010). Os tecidos foram incubados nos anticorpos primários durante 12 horas a 4°C, posteriormente lavados com PBT (3 lavagens de 10 minutos cada) e depois adicionou-se o anticorpo secundário Alexa 588, os quais foram incubados novamente durante 12 horas a 4°C. Por fim os cortes foram lavados em PBS (3 lavagens de 10 minutos cada), marcados com DAPI para visualização dos núcleos celulares (1 µl: 500 µl de PBS durante 2 minutos), lavados novamente com PBS (3 lavagens de 10 minutos cada), água destilada (1 lavagem de 10 minutos) e por fim adicionou-se glicerol a 100% e lamínula. Uma vez finalizada a imunohistoquímica, as lâminas foram armazenadas no escuro a 4°C e posteriormente analisadas com microscópio invertido de fluorescência Leica Dmi8 e microscópio confocal Leica CTR6 LED.

Resultados

O anticorpo Bs-Vasa se liga especificamente à proteína Vasa de *S. canopus* embora também se ligue inespecificadamente a outras proteínas

Os dados de western blot em extratos de proteína de diferentes tecidos somáticos e germinativos de *Styela canopus* utilizando o anticorpo BS-Vasa para testar a especificidade do mesmo contra o ortólogo de Vasa de *S. canopus* (figura 1) mostram uma banda de

mesmo tamanho (aproximadamente 85 KDa) relatado por Rosner e colaboradores (2009). Essa banda estava presente nos extratos de gônadas + saco branquial (coluna G indicada por seta na figura), nos extratos de células do sangue e também no controle (animal inteiro). Inesperadamente, o anticorpo marcou bandas de aproximadamente 250 KDa em todos os tecidos, exceto intestino (colunas W, M, G e B) e marcou também uma série de bandas dos extratos de sangue (coluna B).

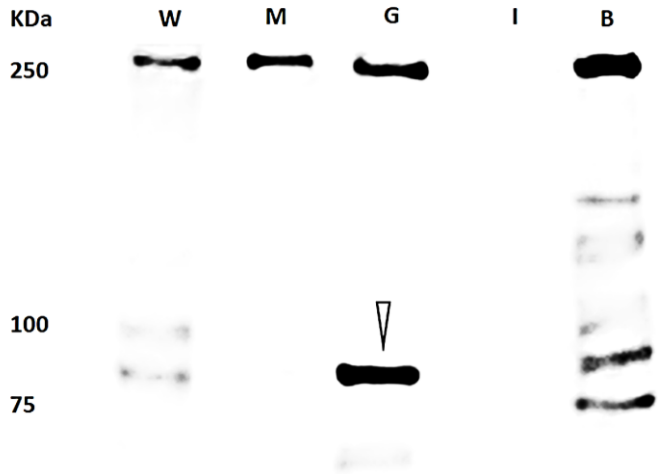

Figura 1

O anticorpo Bl-Piwi mostrou atividade inespecífica

Nos western blots nos quais verificou-se a especificidade do anticorpo BL-Piwi (figura 2) esperava-se obter bandas do tamanho de aproximadamente 90 KDa conforme relatado por Rosner e colaboradores (2009) que geraram o anticorpo especificamente para *Botrylloides leachi* e que foi utilizado neste trabalho na espécie *S. canopus*, embora Brown e colaboradores (2009) tenham relatado uma banda de 42 KDa para o ortólogo da proteína Piwi em outra espécie do gênero, *Botrylloides violaceous*. O experimento de western blot de Piwi não indicaram a presença de nenhuma banda do tamanho esperado nos extratos dos tecidos de *S. canopus*. Verificou-se duas bandas nos extratos do controle (coluna W) e gônadas + saco branquial (coluna G) de aproximadamente 30 e 55 KDa. Uma outra banda mais forte de 75 KDa surgiu nos extratos de sangue (coluna B) e, mais fraca, nos extratos do manto (coluna M).

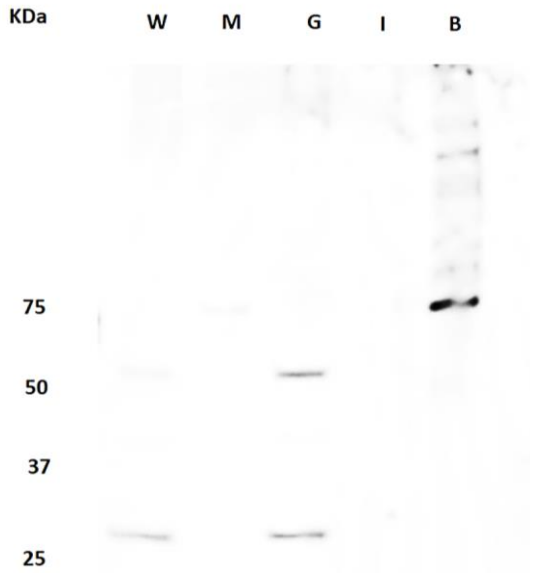

Figura 2

Bs-PL10 se liga especificamente à proteína PL10 de *S. canopus* embora também se liga inespecificamente a outras proteínas

Os dados de western blot referentes aos testes de especificidade do anticorpo BS-PL10 (figura 3) mostram duas bandas fortes (indicadas por setas), que aparecem nos extratos de proteína do animal inteiro (coluna W) e nas gônadas + saco branquial (coluna G): uma das bandas apresenta aproximadamente 78 KDa cujo tamanho é o mesmo observado por Rosner e colaboradores (2009); a outra banda possui por volta de 95 KDa. Além destas foram observadas também bandas de 50 KDa nos extratos do animal inteiro e gônadas + saco branquial além de uma banda que surgiu no controle e no intestino e no animal inteiro que apresentou por volta de 30 KDa.

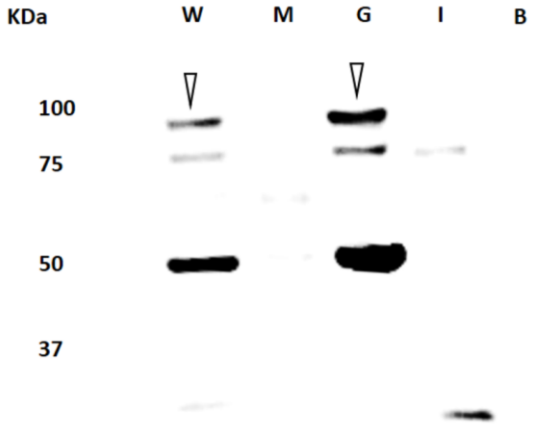

Figura 3

Ci-YB1 reconhece especificamente a proteína YB1 de *Styela canopus*

O western blot no qual testou-se a especificidade do anticorpo CiYB1 (figura 4) mostra apenas uma banda de aproximadamente 55 KDa no extratos de animal inteiro (coluna W), gônadas + saco branquial (coluna G) e intestino (coluna I) estando assim de acordo com o tamanho verificado por Tanaka e colaboradores (2004) de 55 KDa..

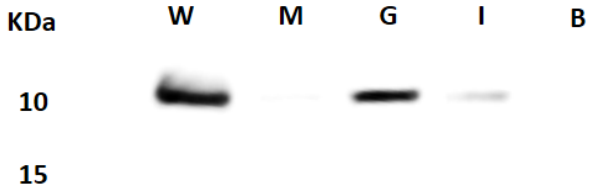

Figura 4

No sentido de avaliar a especificidade dos anticorpos gerados para outras espécies de ascídias na espécie *Styela canopus*, realizou-se extratos de proteína de diferentes tecidos somáticos (intestino, manto e sangue), germinativos (gônadas) além de um organismo que foi utilizado inteiro na extração como controle. Os resultados permitem concluir que o anticorpo gerado para proteina CiYB1 de *Ciona* por Tanaka e colaboradores foi o único que apresentou uma banda única no western blot, tanto no controle quanto na gônadas, sugerindo uma boa especificidade e reatividade do anticorpo entre espécies de ascídias. Por outro lado, o anticorpo BL-Piwi mostrou atividade inespecífica, se ligando a pelo menos três tipos diferentes de proteínas e nenhum destas apresentou o tamanho

esperado para a proteína Piwi de tunicados. Além disso, os anticorpos BS-Vasa e BS-PL10 produzidos especificamente para ascídia *Botryllus schlosseri* reconheceram especificamente os ortólogos de Vasa e PL10, respectivamente na ascídia *Styela canopus* porém também reconheceram outras proteínas em ambos os casos. No sentido de atestar os resultados observados nos western blots, foram realizadas imunohistoquímicas em cortes histológicos de três espécimes de *S. canopus* (tunicado solitário) e de um espécime de *Symplegma rubra* (tunicado colonial) e posteriormente analisados sob microscopia confocal. Os resultados são descritos a seguir.

O anticorpo Bs-Vasa marca as gônadas e células do sangue da ascídia solitária *S. canopus*

O ortólogo de Vasa do tunicado solitário *Styela canopus* se mostrou praticamente ausente nas gônadas de 2/3 dos espécimes (figuras 5B e 6B); apesar disso, nos indivíduos que apresentaram ausência de marcação nas gônadas também observaram-se células do sangue com marcação (figuras 5F e 6F); no único espécime com marcação nas gônadas também observou-se muitas células do sangue e também algumas células epiteliais do manto com marcação (figura 7F e 7H). A ausência de marcação nas gônadas de 2/3 dos espécimes analisados juntamente com a marcação das células epiteliais do manto por um marcador de proteína de linhagem germinativa extremamente conservada nos metazoários (GUSTAFSON & WESSEL, 2010) indica que a marcação do anticorpo pode ser inespecífica, uma vez que marcação de Vasa nos oócitos já foi relatada utilizando imunohistoquímica na ascídia solitária *Ciona* (SHIRAE-KURABAYASHI et al., 2006) assim como nos oócitos da colonial *B. schlosseri* (ROSNER et al, 2009) e via hibridização *in situ* Brown e colaboradores (2009) também relataram a presença do transcrito *vasa* em *B. schlosseri*.

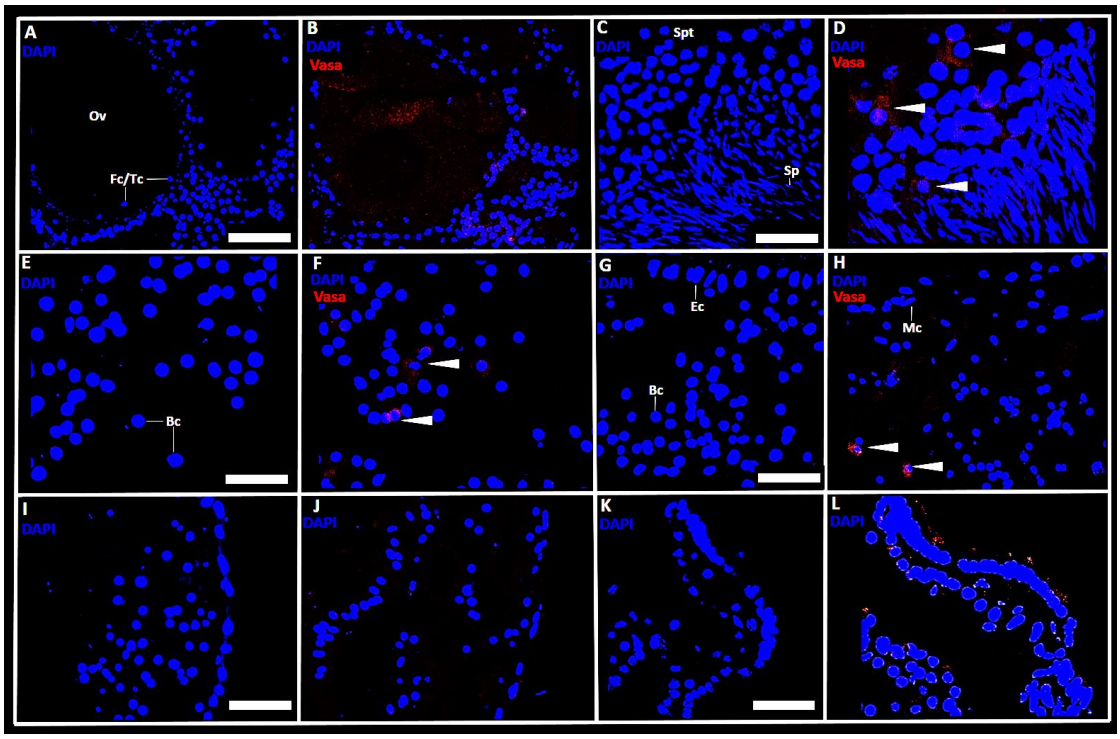

Figura 5 (espécime 1): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *S. canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Vasa); C: Testículo (controle); D: Testículo (Vasa); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (Vasa); G: Manto (controle); H: Manto (Vasa); I: Intestino (controle); J: Intestino (Vasa); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Vasa). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc: Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

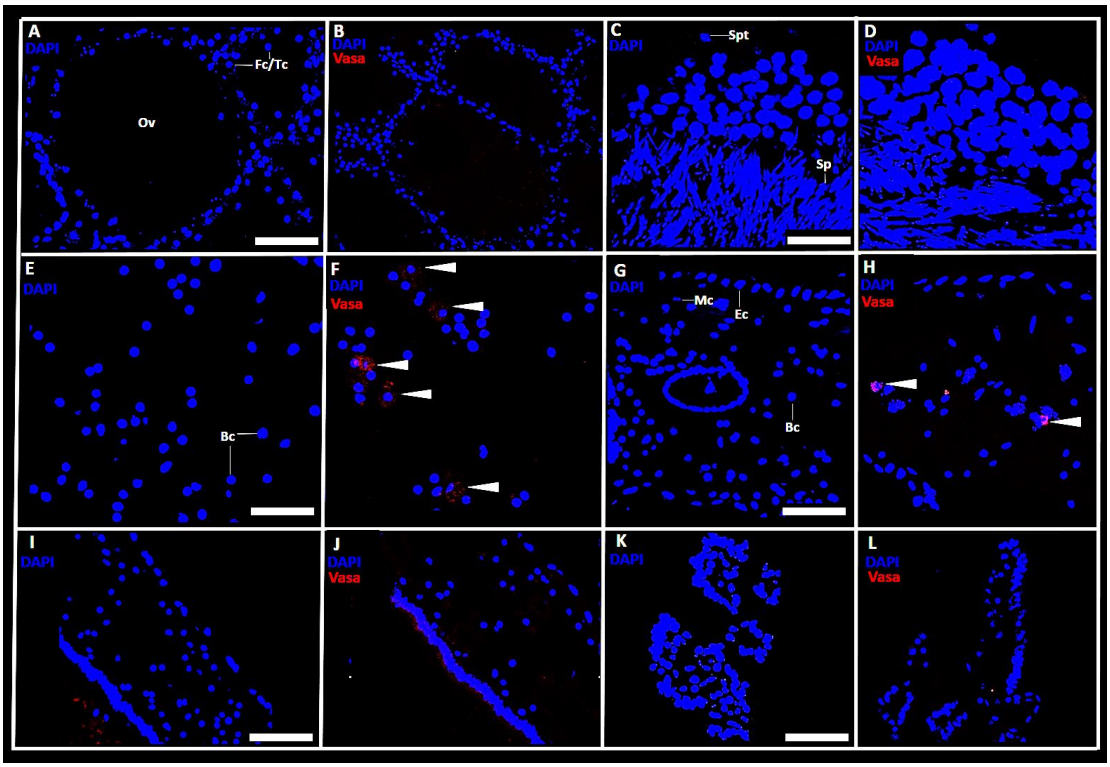

Figura 6 (espécime 2): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Vasa); C: Testículo (controle); D: Testículo (Vasa); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (Vasa); G: Manto (controle); H: Manto (Vasa); I: Intestino (controle); J: Intestino (Vasa); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Vasa). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

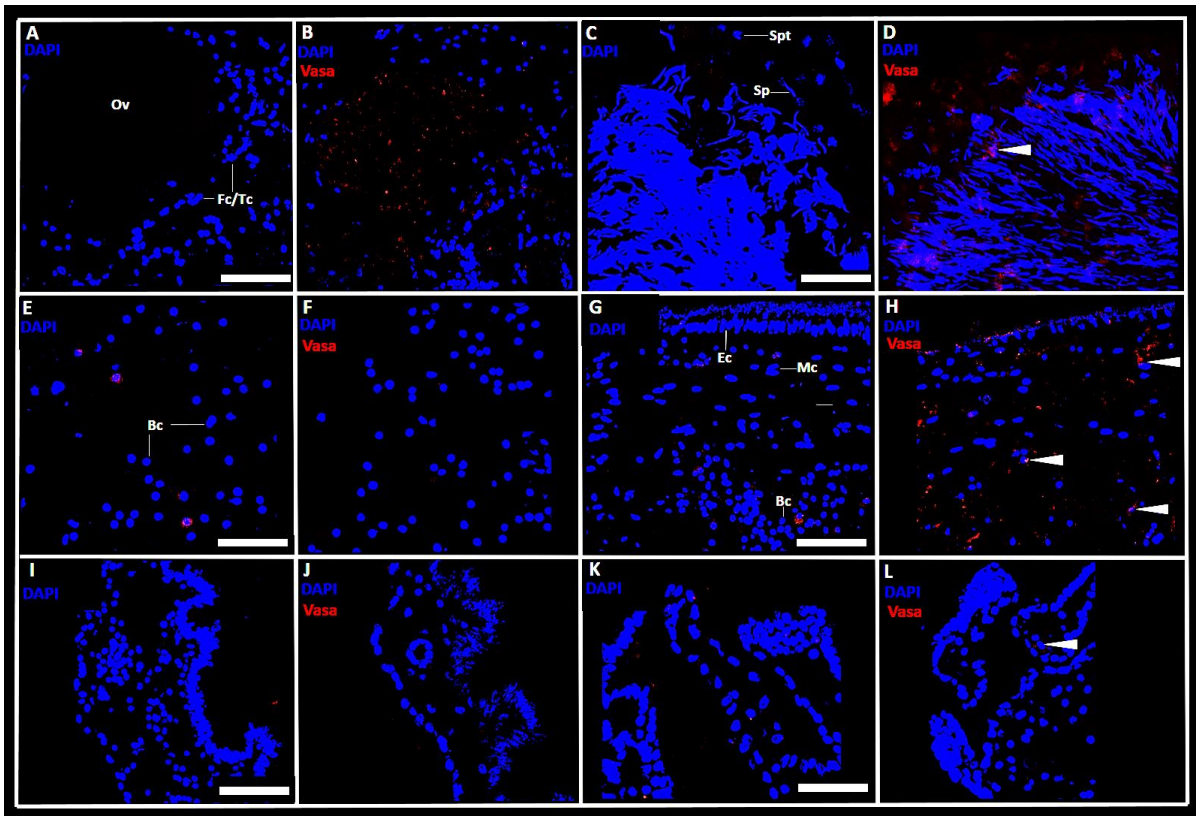

Figura 7 (espécime 3): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Vasa); C: Testículo (controle); D: Testículo (Vasa); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (Vasa); G: Manto (controle); H: Manto (Vasa); I: Intestino (controle); J: Intestino (Vasa); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Vasa). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm , C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

O anticorpo Bs-Vasa marca os oócitos e células da vasculatura da ascídia colonial *Symplegma rubra*

No espécime colonial *S. rubra* analisado (figura 8) a marcação se deu nos oócitos, nas células da vasculatura e em menor nível no intestino (figuras 8B, 8F e 8J); no testículo, manto e saco branquial não foi observada a presença da proteína (figuras 8D, 8H e 8L). É possível que o anticorpo BS-Vasa marca especificamente a proteína ortóloga de Vasa apenas da ascídia colonial ao mesmo tempo que marca inespecificamente proteínas da

ascídia solitária, embora não seja possível confirmar essa hipótese devido à ausência de dados de western blots da ascídia colonial; outra possibilidade é que as células do sangue da solitária representam apenas células autoflorescentes, uma vez que contagens das células nos controles mostraram a presença de um número significativo de células autofluorescentes (dados não mostrados). O anticorpo aqui utilizado é o BS-Vasa que marca especificamente a proteína Vasa de *Botryllus schllosseri*, espécie a qual *Symplegma rubra* é grupo-irmão; portanto é provável que o anticorpo marque especificamente a proteína Vasa de *S. rubra* mas não de *S. canopus*, embora as análises bioinformáticas mostrem alta homologia entre os ortólogos de Vasa de vários tunicados como *B. primigenus, Polyandrocarpa misakiensis, Botrylloides violaceus, Ciona savignyi* e *Ciona intestinalis* (ROSNER et al., 2009).

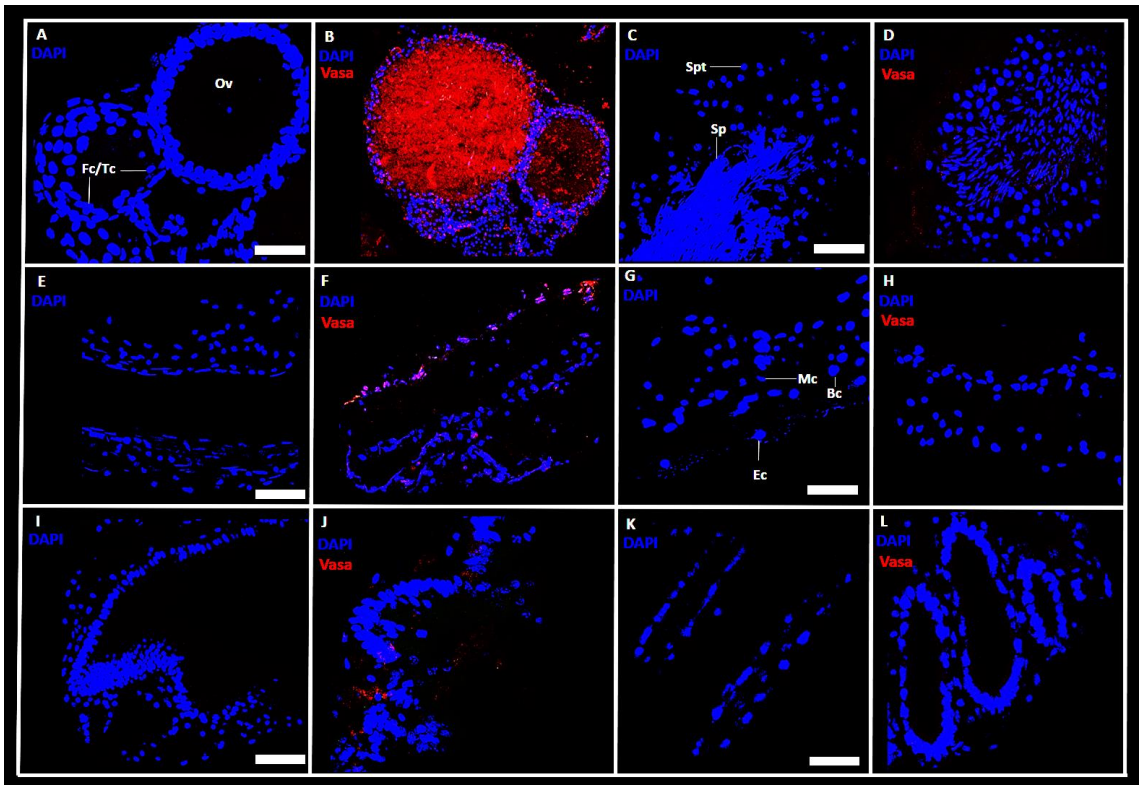

Figura 8: Secções histológicas em corte transversal da ascídia colonial *S. rubra* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Vasa); C: Testículo (controle); D: Testículo (Vasa); E: Vaso sanguíneo (controle); F: Vaso sanguíneo (Vasa); G: Manto (controle); H: Manto (Vasa); I: Intestino (controle); J: Intestino (Vasa); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Vasa). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

O padrão de localização da proteína Piwi nos tecidos somáticos *S. canopus* indica inespecificidade do anticorpo

Dentre todos os anticorpos utilizados, BL-Piwi produzido especificamente para marcar a proteína Piwi de *Botrylloides leachi* por Rinkevich e colaboradores (2010) foi o que marcou a maior quantidade de células (figura 9), indicando de forma indireta que a proteína pode ser a mais expressa entre os marcadores testados. Os oócitos e células do sangue de todos os espécimes de *S. canopus* analisados mostram marcação (figuras 9B, 9F, 10B, 10H, 11B e 11F)). Em 2/3 dos espécimes solitários também observou-se marcação nos testículos e no intestino; Jiménez e colaboradores (2019) também observaram marcação de Piwi no intestino utilizando um anticorpo comercial específico para a proteína Piwi de *D. melanosgaster* na ascídia solitária *Styela plicata*. No presente trabalho foram testados três espécimes de *S. canopus*: um deles mostrou ausência de marcação (figura 10J), outro mostrou marcação inespecífica (figura 19J) e outro mostrou marcação aparentemente verdadeira (figura 11J).

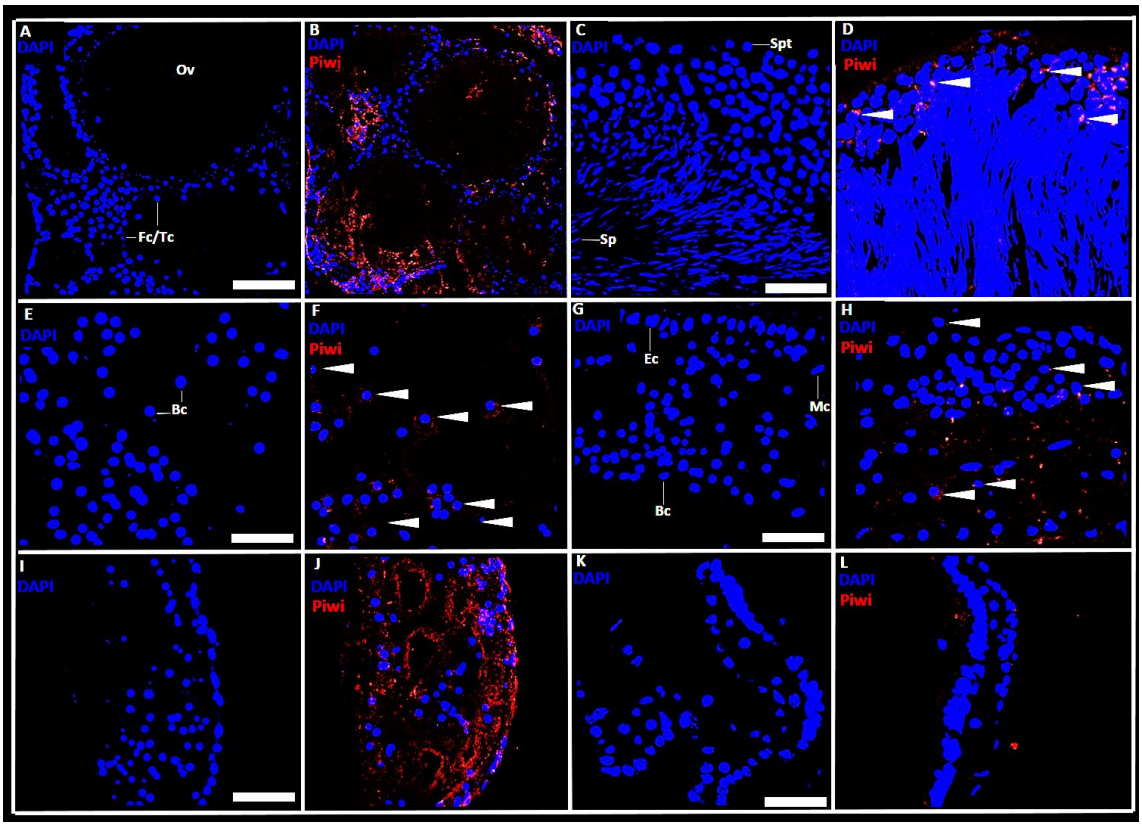

Figura 9 (espécime 1): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Piwi); C: Testículo (controle); D: Testículo (Piwi); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (Piwi); G: Manto (controle); H: Manto (Piwi); I: Intestino (controle);

J: Intestino (Piwi); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Piwi). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células “test”, Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm , C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

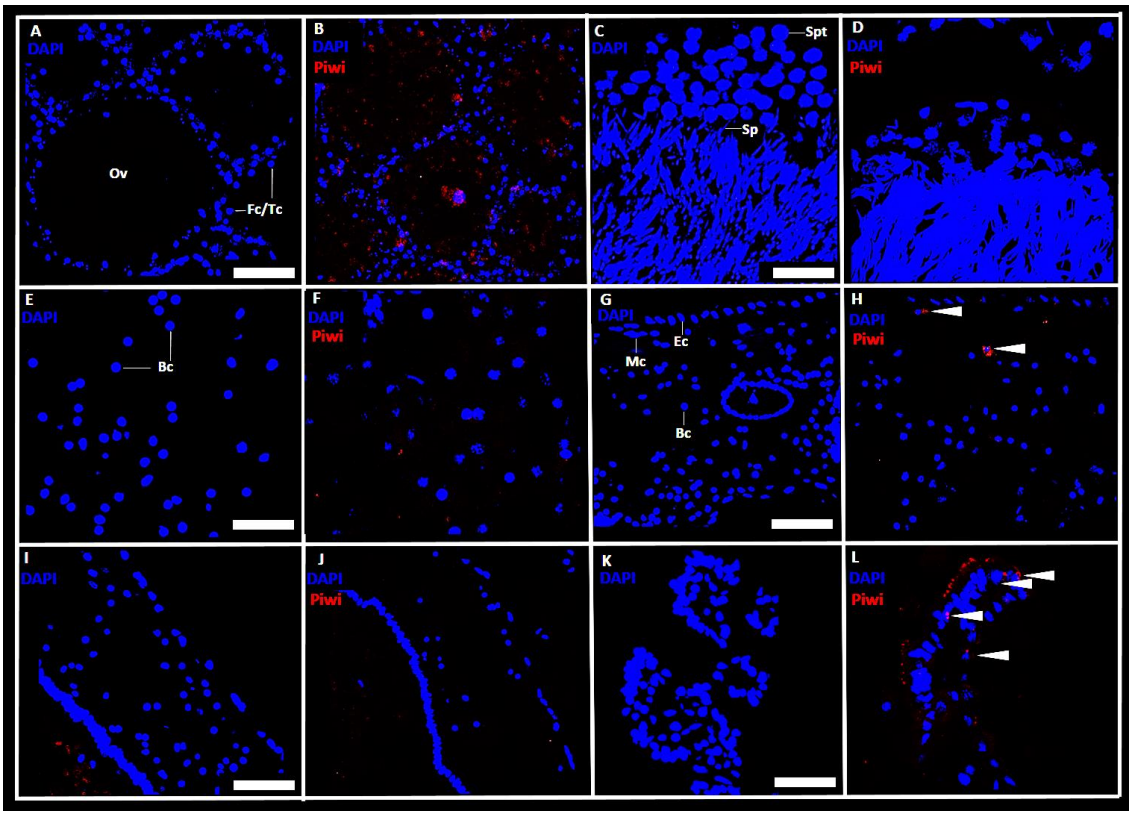

Figura 10 (espécime 2): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Piwi); C: Testículo (controle); D: Testículo (Piwi); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (Piwi); G: Manto (controle); H: Manto (Piwi); I: Intestino (controle); J: Intestino (Piwi); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Piwi). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células “test”, Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

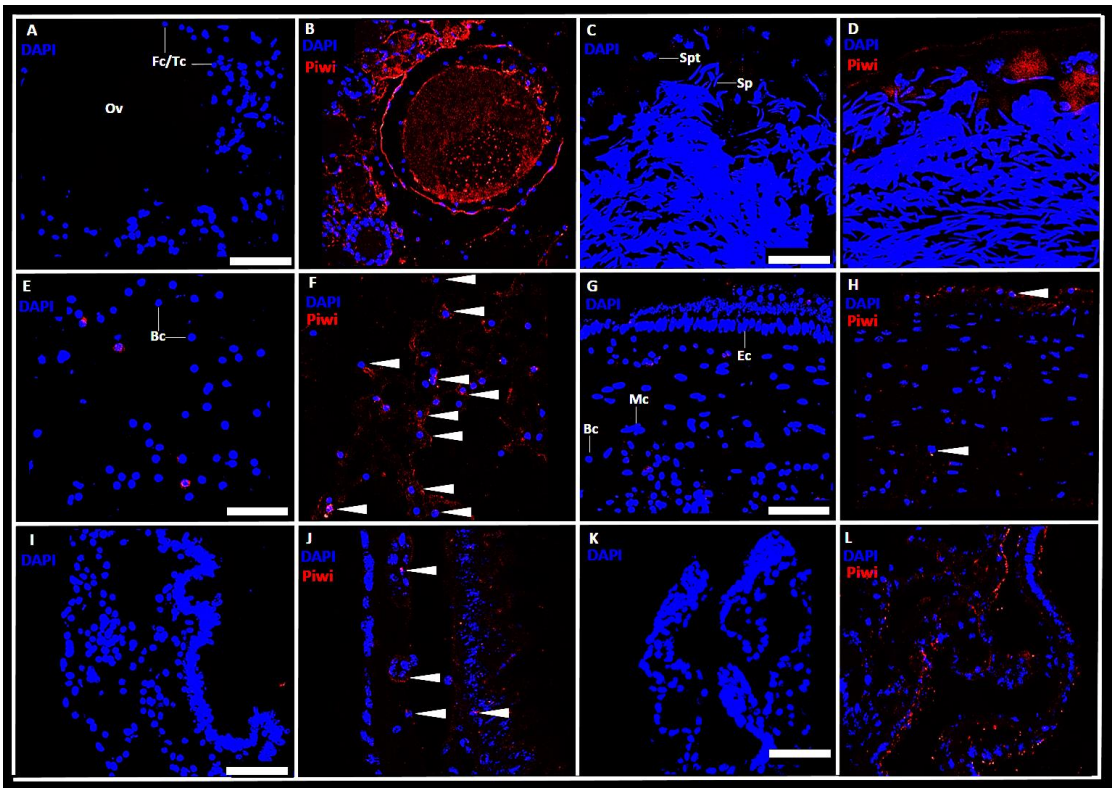

Figura 11 (espécime 3): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Piwi); C: Testículo (controle); D: Testículo (Piwi); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (Piwi); G: Manto (controle); H: Manto (Piwi); I: Intestino (controle); J: Intestino (Piwi); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Piwi). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

BI- Piwi marca os oócitos e células da vasculatura de *S. rubra*

O experimento de imunohistoquímica na ascídia colonial (figura 12) mostra que Piwi se localiza principalmente nos oócitos (figura 12B); células que formam a vasculatura da colonial *S. rubra* utilizada no presente trabalho (figura 12 F) mostraram marcação de modo semelhante ao relatado para *Botrilloides leachi* (RINKEVICH et al, 2010), células circulatórias que expressam Piwi estão envolvidas no processo de regeneração de corpo inteiro em *Botrylloides leachi* e elas se originam de células aderidas à parede interna do vasos que compõem o sistema circulatório (RINKEVICH et al., 2010); uma marcação mais fraca também aparece no saco branquial, testículo e manto (figuras 12L, 12D e 12H). Apesar de não existirem dados de western blot para extratos de proteínas da ascídia colonial, o padrão de localização em *S. rubra* sugere que a marcação deste anticorpo, produzido na colonial *Botrylloides leachi* é especifico (figura 11).

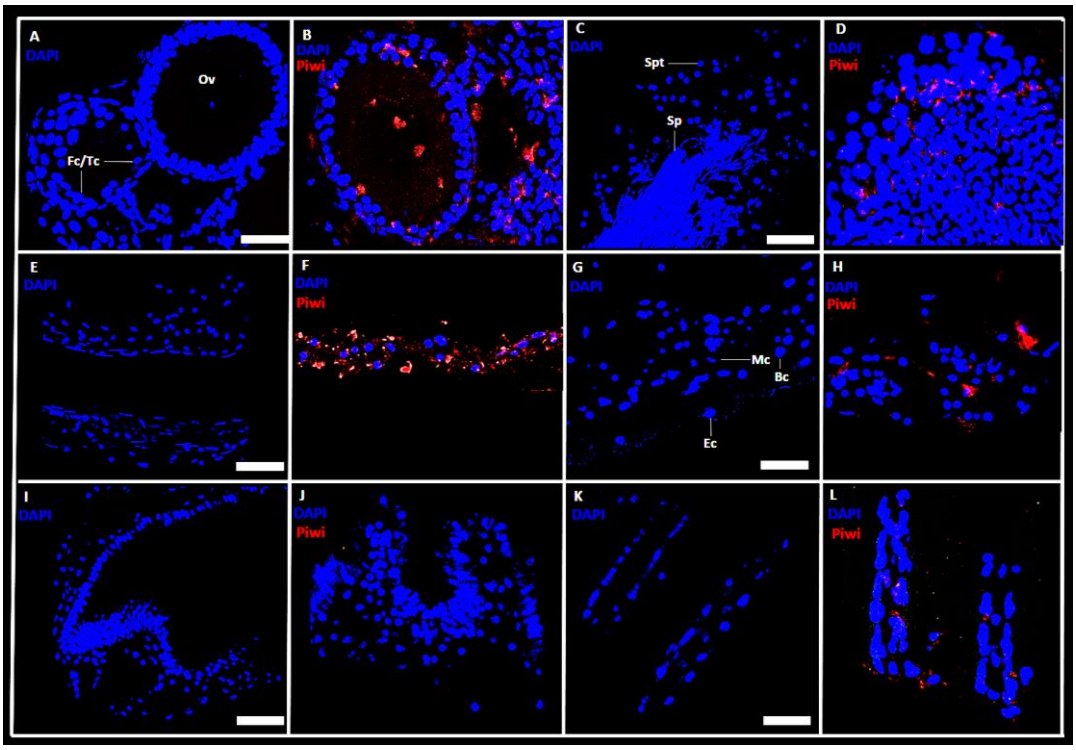

Figura 12 (espécime 1): Secções histológicas em corte transversal da ascídia colonial *S. rubra* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (Piwi); C: Testículo (controle); D: Testículo (Piwi); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (Piwi); G: Manto (controle); H: Manto (Piwi); I: Intestino (controle); J: Intestino (Piwi); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (Piwi). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

PL10 se localiza principalmente nas células germinativas do testículo e nos oócitos da solitária *S. canopus*

Os padrões de localização da proteína PL10 variaram substancialmente entre os espécimes. Os espécime 1 (figura 13) mostrou marcação em todos os tipos celulares que formam o testículo, desde as células-tronco espermatogoniais na periferia do testículo até os espermatozóides, PL10 também se localiza em algumas células acessórias (células foliculares e células "test") ao redor dos oócitos; o espécime 2 (figura 14) mostrou forte marcação distribuída uniformemente no citoplasma dos oócitos (em todos os estágios de diferenciação), nos testículos de forma semelhante ao observado no espécime 1 e também em algumas células sanguíneas próximas ao manto; e por fim no espécime 3 (figura 15) também observou-se marcação nos oócitos e nos testículos, porém neste caso a marcação se via apenas no citoplasma de algumas células na periferia do testículo, que representam as células mais indiferenciadas.

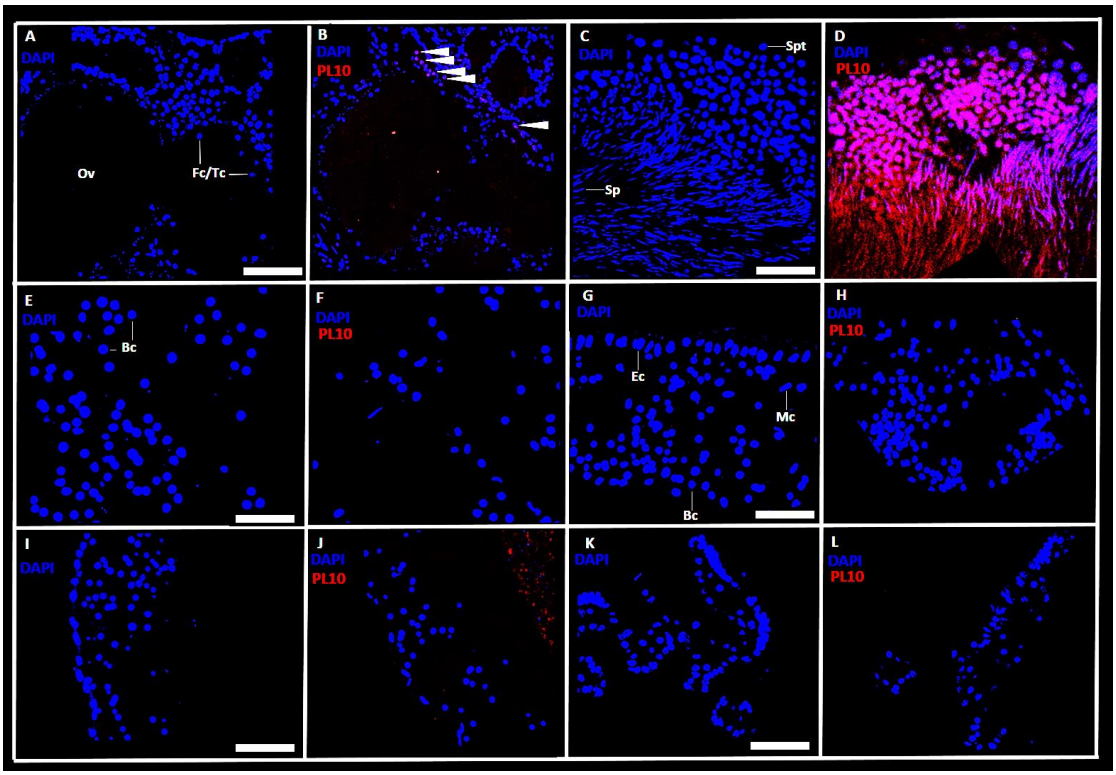

Figura 13 (espécime 1): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (PL10); C: Testículo (controle); D: Testículo (PL10); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (PL10); G: Manto (controle); H: Manto (PL10); I: Intestino (controle); J: Intestino (PL10); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (PL10). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm , C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

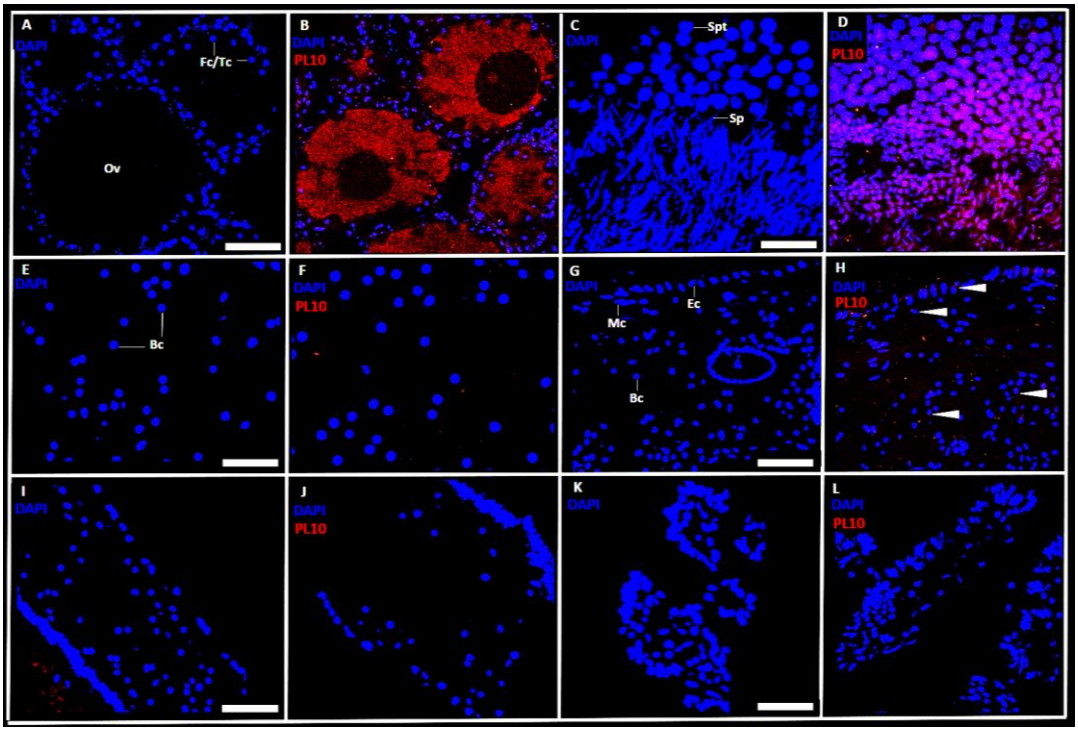

Figura 14 (espécime 2): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (PL10); C: Testículo (controle); D: Testículo (PL10); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (PL10); G: Manto (controle); H: Manto (PL10); I: Intestino (controle); J: Intestino (PL10); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (PL10). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

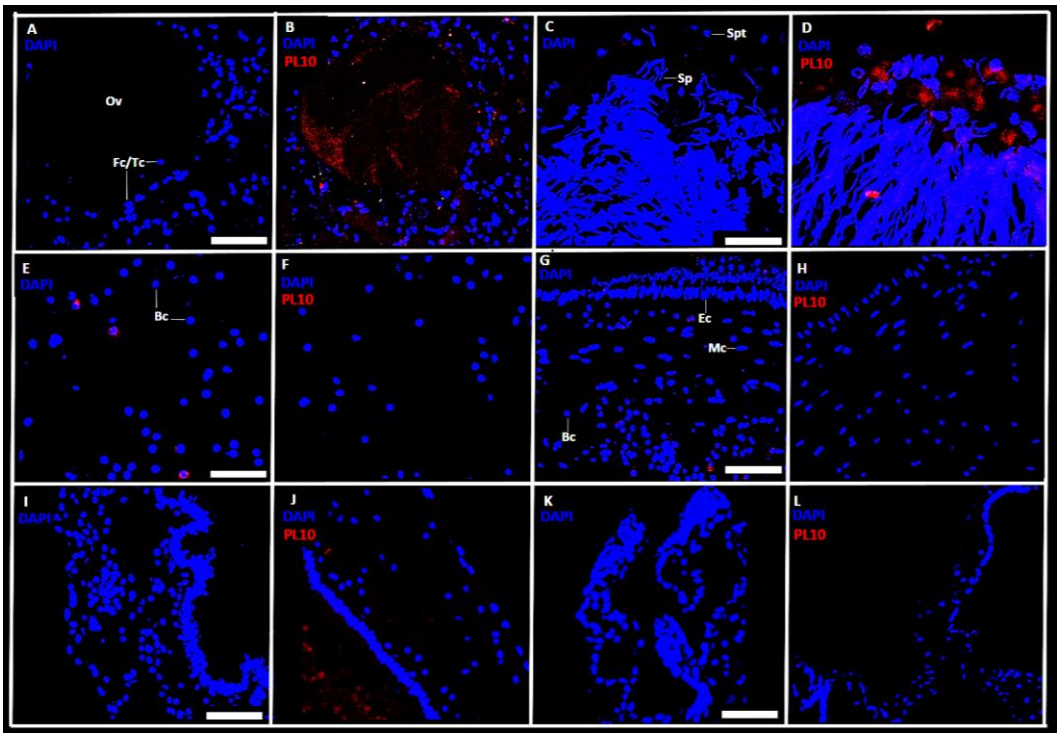

Figura 15 (espécime 3): Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (PL10); C: Testículo (controle); D: Testículo (PL10); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (PL10); G: Manto (controle); H: Manto (PL10); I: Intestino (controle); J: Intestino (PL10); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (PL10). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

PL10 se localiza principalmente nos oócitos da colonial *S. rubra* e inesperadamente, no intestino e saco branquial

O espécime colonial mostrou marcação nos oócitos (figura 16B) conforme observado em outras ascídias coloniais botrillídeas, porém inesperadamente observou-se a presença da proteína em órgãos somáticos tais como intestino e saco branquial (figuras 16J e 16L). Embora Rosner e colaboradores (2006) relatem em seus trabalho a presença de PL10 em

órgãos somáticos tais como endóstilo, brotos e nas papilas adesivas da papila, a marcação no intestino e saco branquial não foi relatada.

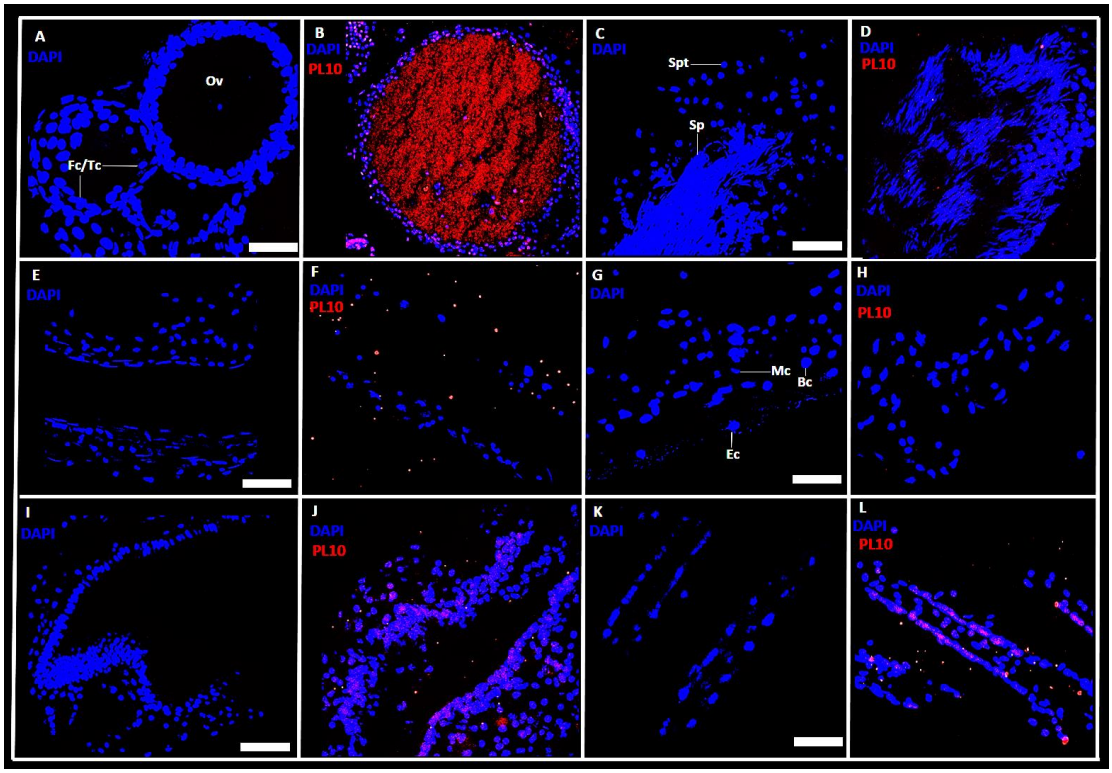

Figura 16: Secções histológicas em corte transversal da ascídia colonial *S. rubra* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (PL10); C: Testículo (controle); D: Testículo (PL10); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (PL10); G: Manto (controle); H: Manto (PL10); I: Intestino (controle); J: Intestino (PL10); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (PL10). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

Ci-YB1

O capítulo 2 do presente trabalho trata apenas dos padrões de localização celular bem como implicações evolutivas relacionadas à proteína YB1 em *Styela canopus.* Yb1 mostrou um novo padrão de localização celular e subcelular durante a espermatogênese desta espécie, e o anticorpo gerado por *Ciona* reconheceu uma única proteína do tamanho previsto em nos western blots de extratos proteicos da espécie

Discussão

As proteínas Vasa, Piwi, PL10 e YB1 são expressas em células-tronco germinativas e/ou células primordiais da linhagem germinativa (SOLANA, 2013) de diversos organismos

metazoários e cada uma desempenha funções diferentes nestes tipos celulares. Organismos que apresentam reprodução sexuada ocorrendo concomitantemente a outros processos do desenvolvimento tais como reprodução assexuada ou regeneração (parcial ou de corpo inteiro) tendem a exibir células pluripotentes com potencial germinativo e somático; cnidários, planárias e tunicados apresentam respectivamente células intersticiais, neoblastos e hemoblastos que correespondem à células indiferenciadas com potencial somático e germinativo nestes organismos (SOLANA, 2013).

Nos tunicados do clado Styelidae, existem espécies com modos de vida solitário e colonial e acredita-se que ambos se originaram de um organismo solitário (ALIÉ et al., 2018); tunicados solitários apresentam apenas reprodução sexuada e potenciais limitados de regeneração (JEFFERY, 2014) enquanto coloniais apresentam reprodução sexuada ocorrendo concomitante e independentemente de outros processos tais como brotamento e regeneração de corpo inteiro (BROWN et al., 2009a; BROWN et al., 2009b) deste modo espera-se que os padrões de expressão e localização celular de proteínas de linhagem germinativa sejam diferentes nestes organismos com modos de vida distintos. De fato, alguns trabalhos têm se dedicado a estudar a linhagem germinativa nas ascídias do clado *Botryllus* + *Symplegma* bem como a entender os processos independentes de evolução da colonialidade que ocorreram no clado Styelidae. Muitos destes trabalhos têm demonstrado que hemoblastos participam tanto de processos germinativos quanto somáticos (BROWN et al., 2009a; BROWN et al., 2009b; SUNANAGA, INUBUSHI & KAWAMURA, 2010; KAWAMURA & SUNANAGA, 2010; KAWAMURA et al., 2011;). Entretanto carecem na literatura trabalhos que tenham utilizados ascídias solitárias do clado Styelidae para compreender os processos de evolução da colonialidade que tem ocorrido no grupo.

Algumas proteínas (como Piwi, por exemplo) que são frequentemente utilizadas como marcadores de linhagem germinativa também são utilizados como marcadores de células-tronco ou de células indiferenciadas. A presença de células indiferenciadas em tecidos somáticos de organismos adultos geralmente está relacionada a processos do desenvolvimento como regeneração. De fato Jeffery (2014) estudando regeneração parcial em *Ciona* notou que células Piwi positivas do saco branquial são mobilizadas para atuar no processo de regeneração; a participação de Piwi em processos somáticos do desenvolvimento tem sido observado também em outros modelos (THOMSON & LIN, 2009). Rosner, Paz & Rinkevich (2006) também relataram a presença de PL10 em tecidos somáticos da colonial *Botryllus schlosseri.*

No sentido de corroborar os resultados aqui observados seria necessária a realização de uma série de experimentos: 1) western blots nos extratos de proteína da ascídia colonial *Symplegma rubra* utilizando os quatro anticorpos testados no presente trabalho; 2) realização de imunohistoquímicas em mais espécimes da colonial *S. rubra* (os resultados aqui descritos foram obtidos a partir da análise de um único espécime devido à dificuldade de se encontrar coloniais com gônadas em certas épocas do ano); 3) uma análise de microscopia confocal numa amostra maior de células sanguíneas a fim de se verificar se as células positivas para Piwi e Vasa observadas tratam-se apenas de células autofluorescentes, marcação inespecífica ou se de fato são células verdadeiramente positivas; 4) análises bioinformáticas utilizando o transcriptoma de *S. canopus* com o objetivo de verificar a similaridade das sequências de Vasa, Piwi, PL10 e YB1 de *Botryllus schlosseri*, *Botrylloides leachi* e *Ciona* sp. com as respectivas proteínas ortólogas de *Styela canopus*, com ênfase maior nas nas sequências destas proteínas que são reconhecidas pelo anticorpo; 5) hibridização *in situ*, southern blots e RT-PCRs no sentido de verificar os padrões de expressão e localização celular dos transcritos *vasa, piwi, pl10* e *yb1* e comparar com os padrões observados através das metodologias utilizadas no presente trabalho. Os experimentos sugeridos em 1, 2, 3 e 4 estão sendo conduzidos atualmente e serão apresentados no momento da defesa desta dissertação e servirão para complementar os dados aqui descritos e também aqueles dados do capítulo 2, cujo artigo resultante já está em fase de preparação.

Conclusão

O anticorpo CiYB1 mostrou ser os mais específicos devido à presença de uma única banda de tamanho esperado nos western blots e também ao padrão de marcação na imunohistoquímica conduzida em três diferentes espécies de *S. canopus* e em um espécime de *S. rubra.* Devido a isso, o segundo capítulo deste trabalho é inteiramente dedicado aos resultados obtidos por meio da análise dos padrões de localização da proteína YB1. Todos os outros anticorpos utilizados demonstraram níveis maiores ou menores de inespecificidade, seja pela presença de outras bandas além das esperadas (no caso dos anticorpos BS-Vasa e BS-PL10) ou pela presença de inúmeras bandas no western blot cujos tamanhos não correspondem à proteína esperada (no caso do anticorpo BL-Piwi).

Referências

BROWN, Federico D. SWALLA, Billie. Vasa expression in a colonial ascidian, Botrylloides violaceus. EVOLUTION & DEVELOPMENT 9:2, 165–177 (2007). DOI: 10.1111/j.1525-142X.2007.00147.x

BROWN et al., Federico D. Early lineage specification of long-lived germline precursors in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. Development 136, 3485-3494 (2009) doi:10.1242/dev.037754

FUJIMURA, Miyuki; TAKAMURA,, Katsumi. Characterization of an ascidian DEAD-box gene, Ci-DEAD1: specific expression in the germ cells and its mRNA localization in the posterior-most blastomeres in early embryos. Dev Genes Evol (2000) 210:64–72. DOI: ttps://doi.org/10.1007/s004270050012

JEFFERY, Willian R. Distal regeneration involves the age dependent activity of branchial sac stem cells in the ascidian Ciona intestinalis. doi: 10.1002/reg2.26

KASSMER et al., Migration of germline progenitor cells is directed by sphingosine-1-phosphate signalling in a basal chordate. NATURE COMMUNICATIONS | 6:8565 | DOI: 10.1038/ncomms9565

Langenbacher and De Tomaso.Temporally and spatially dynamic germ cell niches in *Botryllus schlosseri* revealed by expression of a TGF-beta family ligand and *vasa*. *EvoDevo (2016) 7:9* DOI 10.1186/s13227-016-0047-5

ROSNER,Amalia, PAZ, Guy & RINKEVICH, Baruch Divergent Roles of the DEAD-Box Protein BSPL10, the Urochordate Homologue of Human DDX3 and DDX3Y Proteins, in Colony Astogeny and Ontogeny. DEVELOPMENTAL DYNAMICS 235:1508–1521, 2006. DOI: 10.1002/dvdy.20728

RINKEVICH et al., Piwi positive cells that line the vasculature epithelium, underlie whole body regeneration in a basal chordate, Developmental Biology 345 (2010) 94–104. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.05.500

ROSNER et al., Vasa and the germ line lineage in a colonial urochordate. Developmental Biology 331 (2009) 113–128. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.04.025

SHIRAE-KURABAYASHI et al., Dynamic redistribution of vasa homolog and exclusion of somatic cell determinants during germ cell specification in Ciona intestinalis. Development 133, 2683-2693 (2006) DOI:10.1242/dev.02446

Tanaka et al,.CiYB1 is a major component of storage mRNPs in ascidian oocytes: implications in translational regulation of localized mRNAs. Developmental Biology 272 (2004) 217– 230. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.032

WADA et al.,An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryo. Develop. Growth Differ.(1998) 40, 631-640. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1998.t01-4-00007.x

Capítulo 2

Localização celular da proteína YB1 na gametogênese em tunicados solitários e coloniais do clado Styelidae

David dos Santos Soares[1 2];Thiago Giove Mitsugi[3]; Federico D. Brown [1 2]

(artigo em fase de preparação)

1 – Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

2 – Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMAR), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

3 – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo

A gametogênese é um processo fundamental em metazoários que apresentam reprodução sexuada e de modo geral se caracteriza pela diferenciação de células diplóides em células haplóides especializadas, incluindo uma série de tipos celulares intermediários. Embora os mecanismos moleculares que controlam a espermatogênese e a oogêse bem como as alterações morfológicas envolvidas no processo sejam bem estudados em mamíferos e outros organismos-modelo não coloniais, existem poucos estudos no que tange à perfis de expressão e localização celular de proteínas específicas de células germinativas de tunicados. Os tunicados são cordados invertebrados marinhos cujos aspectos reprodutivos têm sido estudados devido às várias aquisições independentes de brotamento, de modo que muitas espécies do clado apresentam capacidade de reprodução sexuada e assexuada ocorrendo concomitantemente. Estudos prévios em *Ciona,* um tunicado solitário, realizados por Tanaka e colaboradores (2004) demonstraram a expressão da proteína YB1 em células germinativas; no estudo CiYB1 (homóloga à proteína Y-box 1 dos vertebrados) estaria reprimindo a tradução de mRNAs como *Cipem* e *Cimacho-1*, que são mRNAs associados ao plasma germinativo. Por meio de western blot, imunohistoquímica e microscopia confocal nas ascídias do clado Styelidae *Styela canopus* e *Symplegma rubra* (solitária e colonial, respectivamente) notou-se: 1) expressão nuclear de YB1 em todos os estágios de diferenciação celular na espermatogênese, desde as espermatogônias até os espermatídeos da ascídia solitária *Styela canopus*; as espermátides desta espécie exibem também localização da proteína YB1 no flagelo; 2) ausência de marcação por YB1 no testículo da ascídia colonial *Symplegma rubra*; 3) marcação YB1 nos oócitos da ascídia solitária *Styela canopus* e da colonial *Symplegma rubra,* corroborando observações anteriores em oócitos de *Ciona* sp. Os resultados obtidos sugerem que o

anticorpo CiYB1 marca especificamente a proteína YB1 das células germinativas das espécies aqui utilizadas, e inesperadamente marca também as células do testículo de *S. canopus* indicando que o padrão de localização desta proteína nas células germinativas do testículo pode variar entre espécies. A função de YB1 na espermatogênese de *S. canopus* permanece desconhecida. Proteínas da subfamília Y-box 1 podem apresentar diferentes funções, desde o controle da transcrição no núcleo até o sequestro de mRNAs em complexos de ribonucleoproteínas no citoplasma, configurando inibição da tradução dos mesmos. Essa classe de proteínas apresenta domínios de ligação a ácidos nucleicos e pode estar exercendo diferentes funções ao longo da espermatogênese do tunicado solitário *Styela canopus* mas não de *Ciona* sp. ou do tunicado colonial *Symplegma rubra*, os quais não mostram localização nos testículos. Seria interessante estabelecer se PEM-1 e macho-1 se expressam na espermatogênese desta espécie no sentido de entender quais funções YB1 desempenha nesta espécie.

Palavras-chave: espermatogênese, oogênese, CiYB1, tunicados solitários e coloniais

Abstract

Gametogenesis is a fundamental process in metazoans with sexual reproduction and is generally characterized by the differentiation of diploid cells into specialized haploid cells, including a number of intermediate cell types. Although the molecular mechanisms that control spermatogenesis and oogenesis, as well as the morphological changes involved in the process, are well studied in mammals and other non-colonial model organisms, there are few studies regarding the expression and cellular localization patterns of proteins that are specifically expressed in germ cells of tunicates. Tunicates are marine invertebrate chordates whose reproductive features have been studied due to various independent budding acquisitions, so that many species of the clade have concomitant sexual and asexual reproduction capabilities. Previous studies in *Ciona* -a solitary phlebobranch tunicate- performed by Tanaka et al. (2004) demonstrated the expression of YB1 protein in germ cells. It was shown that CiYB1 (homologous to vertebrate protein Y-box 1) repressed mRNA translation by forming a complex with CiPEM and Ci-macho1, which are proteins associated with the germplasm. By comparing expression patterns of YB1 in the solitary styelid tunicate *Styela canopus* and the colonial styelid *Symplegma rubra* using western blot, immunohistochemistry and confocal microscopy we find: (1) nuclear localization of YB1 during all stages of spermatogenesis (from spermatogonia to spermatids), as well as in the flagella of spermatids in the solitary ascidian *Styela canopus*; (2) CiYB1 antibody did not label any spermatogenic cells of the testis in the colonial ascidian *Symplegma rubra*; (3) YB1 labeled oocytes in the solitary ascidian *Styela canopus* and in the colonial *Symplegma rubra*, corroborating previous observations in *Ciona*. Therefore, our results show an unexpected expression of YB1 in spermatogenic cells in the testes of *S. canopus*, and confirms expression of YB1 protein during oogenesis of both *S. canopus* and *S. rubra*. The role of YB1 during *S. canopus*

spermatogenesis remains elusive. Proteins of the Y-box 1 subfamily have nucleic acid binding domains and disordered domains that confer different functions to the protein, including controlling transcription in the nucleus or sequestration of mRNAs in ribonucleoprotein complexes in the cytoplasm, thus inhibiting their translation. The absence of YB1 expression during spermatogenesis in the colonial tunicate *S. rubra* or *Ciona* may suggest different and species-specific roles of YB1 proteins across tunicates.

Key-words: spermatogenesis, oogenesis, CiYB1, solitary and colonial tunicates

Introdução

A herança genética ou capacidade de transferir verticalmente material genético para as próximas gerações é necessária para a evolução. Apesar da diversidade de estratégias reprodutivas existentes nos eucariontes, talvez tenham sido no clado dos metazoários que surgiu a maneira mais eficiente, porém energeticamente custosa de reprodução: a reprodução sexuada. Neste processo, duas diferentes células haplóides especializadas denominadas gametas se unem para formar uma única célula diplóide denominada zigoto, cuja consequência da união é o restabelecimento do número normal de cromossomos do organismo, permitindo assim o início da embriogênese. Embora existam exceções, os gametas se caracterizam por serem de dois tipos celulares distintos: um deles, denominado oócito, é uma célula particularmente grande, imóvel, com grande acúmulo de ribonucleoproteínas e outras biomoléculas citoplasmáticas (fatores citoplasmáticos maternos), se localizando normalmente em um órgão denominado ovário e cuja a produção demanda um alto investimento energético do organismo (MATOVA & COOLEY, 2001) o outro, denominado espermatozóide, se localiza nos testículos e se caracteriza por ser uma célula extremamente pequena, móvel, com um pequeno volume de material citoplasmático demandando portanto menos investimento energético em sua produção, fazendo com que possa ser produzido em grandes quantidades (WHITE-COOPER & BAUSEK, 2010)

A gametogênese é caracterizada por dois processos distintos: espermatogênese e oogênese. No que diz respeito à oogênese, a mesma se caracteriza pela presença de uma população de células pequenas denominadas oogônias que se tornarão cada vez maiores durante a vitelogênese dos oócitos devido ao acúmulo de biomoléculas no citoplasma que serão necessárias não apenas para fornecer energia para a embriogênese como também para o controle do processo (MATOVA & COOLEY, 2001;

TANAKA et al., 2004). Embora existam exceções, este padrão descrito é observado em organismos de diferentes filos, inclusive nos cordados. No que diz respeito à espermatogênese, embora existam diferenças importantes na morfologia dos testículos de diferentes clados, um padrão geral pode ser descrito: o testículo é um órgão no qual existe uma população de células relativamente grandes e indiferenciadas denominadas células-tronco espermatogoniais, que se originam de células primordiais germinativas a partir do zigoto (SOLANA, 2013); as espermatogônias, que representam as células-tronco deste órgão darão origem a tipos celulares intermediários tais como espermatócitos I e II e também às espermátides (WHITE-COOPER & BAUSEK, 2010), por fim as espermátides se diferenciam em espermatozóides que representam a célula mais especializada; ao centro dos túbulos seminíferos dos testículos de cordados existe um lúmen que permite a saída dos espermatozóides (ERMAK, 1982; WHITE-COOPER & BAUSEK, 2010).

As proteínas da família Y-box constituem um grupo de proteínas com alta afinidade de ligação a ácidos nucléicos que apresentam uma série de domínios específicos deste tipo de proteína, cuja característica marcante é a presença de domínios ácidos e básicos posicionados de forma alternada (WOLFFE, 1994). Proteínas desta família podem exercer inúmeras funções, desde o reparo de DNA, controle da replicação e transcrição de genes específicos no núcleo até controle do *splicing* de pré-mRNAs e inibição da tradução de mRNAs específicos por meio da interação dos mesmos com a proteína seguida da estocagem em complexos de ribonucleoproteínas no citoplasma (ELISSEVA et al., 2011); essa classe de proteínas também está envolvida em processos patológicos tais como câncer além de estarem relacionadas a respostas ao estresse oxidativo e resistência à drogas (ELISSEVA et al., 2011). Wolffe e colaboradores (1998) observaram que as proteínas CiBY1, CiBY2 e CiBY3 da ascídia *Ciona* sp. são homólogas às proteínas Y-box dos vertebrados. Este mesmo autor foi o primeiro a analisar os padrões de expressão dessas proteínas em tunicados utilizando a ascídia *Ciona* sp. como modelo. As análises de RT-PCR mostraram que a expressão de *ciby1* foi maior nos oócitos menos desenvolvidos e diminiu ao longo da oogênese (WADA et al.,1998). Do início da oogênese até a formação da larva, ou seja, até os estágios finais de embriogênese, os níveis de CiBY1 e CiBY2 foram constantes e mostraram padrões de expressão muito similares um ao outro; por outro lado, CiBY3 mostra expressão apenas a partir do estágio de 32 células (WADA et al.,1998). *ciby1* se distribui de forma uniforme

no ectoplasma dos ovócitos não fertilizados; no estágio de gástrula, os blastômeros que darão origem às células musculares começam a acumular *ciby1* (WADA et al.,1998); *ciby2* mostrou um padrão muito similar, porém no estágio de neurula, células precursoras da placa neural e precursores das células mesenquimais passam a expressar mais fortemente este mRNA, além disso, já no estágio larval, células da epiderme da região do tronco e da região posterior da cauda também mostram aumento significativo da expressão; *ciby3* aparece inicialmente no pólo vegetal do embrião no estágio de gástrula, em estágios mais desenvolvidos, a expressão se concentra nas células musculares, células mesenquimais, cérebro e tubo nervoso (WADA et al.,1998). CiBY1 mostra atividade de ligação a sequências de RNAs, especialmente aquelas sequências ricas em guanina e citosina (WADA et al.,1998). Posteriormente, Tanaka e colaboradores (2004) também analisaram os padrões de expressão das proteínas de Y-box de *Ciona* sp., além de avaliarem a capacidade da proteína de interagir com ácidos nucleicos *in vitro*. Os resultados obtidos indicam que de fato CiYB1 possui capacidade de interação com ácidos nucleicos e Tanaka e colaboradores especularam que no tunicado *Ciona* sp. esta proteína atua diretamente no controle da tradução, por meio do sequestro de mRNAs da maquinaria de tradução seguido do armazenamento em ribonucleoproteínas graças, em parte, à associação com CiYB1 com *Cipem* e *Cimacho-1*, mRNAs que darão origem às proteínas Pem e Macho-1 em *Ciona* sp. respectivamente. Pem-1 tem sido estudada em diversos tunicados e atua na divisão desigual de fatores citoplasmáticos nos estágios iniciais da embriogênese além de controlar a transcrição de diversos genes, particularmente atua na quiescência de blastômeros que darão origem à células da linhagem primordial germinativa (KUMANO & NISHIDA, 2009); *macho-1* é um dos principais componentes do mioplasma dos embriões de tunicados e após a tradução dará origem à proteína Macho-1 que se localiza nas células musculares primordiais da larva, portanto Macho-1 está envolvida na diferenciação de células musculares da larva de tunicados (NISHIDA & SAWADA, 2001). Deste modo, o desacoplamento de CiBY1 dos mRNAs Ci*pem* e Ci*macho-1* possivelmente permite sua tradução em peptídeo no tempo e espaço adequados para que a embriogênese ocorra normalmente; Tanaka e colaboradores observaram que a proteína CiYB1 é o principal componente de mRNPs (ribonucleoproteínas mensageiras) que são complexos citoplasmáticos que sequestram mRNAs da maquinaria de tradução no citoplasma de oócitos; CiYB1 particularmente sequestra os mRNAs Ci*pem* e Ci*macho-1* que estão envolvidos na divisão desigual de fatores citoplasmáticos responsáveis pela

diferenciação de células da linhagem primordial germinativa e pela diferenciação de células precursoras da musculatura da larva, respectivamente. Deste modo CiYB1 tem um papel não apenas na formação da linhagem primordial germinativa como na formação da musculatura larval. No desenvolvimento embrionário, mRNAs estocados no citoplasma devem ser traduzidos apenas num tempo e espaço específicos para que a embriogênese ocorra normalmente, portanto CiYB1 desempenha uma importante função na embriogênese (SARDET et al., 2003; TANAKA et al., 2004).

O presente trabalho representa o primeiro estudo em que os padrões de localização de uma proteína Y-box foram analisados num tunicado colonial assim como é o primeiro estudo em que estes padrões são estudados em tunicados do clado Styelidae, clado no qual existem espécies solitárias e coloniais e cujas evidências mais recentes (obtidas de dados de transcriptoma e evidências embriológicas) sugerem ter um ancestral solitário. Em termos morfofuncionais, espera-se que proteínas de linhagem germinativa apresentem perfis de localização celular e expressão semelhantes em tunicados com histórias de vida solitária ou colonial. O presente trabalho analiza comparativamente os perfis de localização celular de YB1 tanto em oócitos quanto nos testículos do tunicado solitário *Styela canopus* e o tunicado colonial *Symplegma rubra.*

Objetivo

Objetivo principal

Analisar a localização da proteína YB1 durante a gametogênese em tunicados solitários e coloniais do clado monofilético Styelidae

Objetivos específicos

- Analisar se existem diferenças na localização celular e subcelular da proteína YB1 durante a espermatogênese em tunicados solitários e coloniais do clado monofilético Styelidae;
- Analisar se existem diferenças na localização celular e subcelular da proteína YB1 durante a oogênese em tunicados solitários e coloniais do clado monofilético Styelidae;

Materiais e métodos

Coleta e manutenção dos animais

Espécimes de ascídias solitárias (*Styela canopus*) e coloniais (*Symplegma rubra*) foram coletados no Yacht Club de Ilhabela, no litoral do estado de São Paulo, Brasil (coordenadas: 23° 46’ 20” S. 45° 21’ 20”). As ascídias solitárias foram coletadas manualmente de subtratos artificias como bóias e cordas; as coloniais foram coletadas da parede do píer (0-2 metros de profundidade) e outros substratos duros com o auxílio de uma faca, cortadas em quadrados de aproximadamente 1 cm X 1 cm e atadas com linha à lâminas de vidro de microscopia, que foram amarradas ao píer e retornadas ao mar a fim de permitir que a colônia se replicasse e crescesse ao longo das lâminas, que após três semanas foram retiradas do mar e levadas aos aquários do laboratório no Departamento de Zoologia no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde foram prontamente fixadas para evitar a apoptose das gônadas.

Coleta de células sanguíneas

No sentido de obter células do sangue para fins de análise morfológica e também para western blot, indivíduos de *S. canopus* tiveram seus sifões cortados e o sangue foi coletado em tubos que foram centrifugados a 15000 rpm durante 5 minutos e congelados a - 80 °C até o momento da extração de proteínas para o western blot. Para a coleta das células sanguíneas das coloniais, os espécimes foram limpos e imersos numa solução anticoagulante seguindo o protocolo de Ballarín & Cima (2005), o sangue foi coletado em tubos por meio de cortes nas ampôlas, depois o sangue coletado foi centrifugado e congelados da mesma forma que foi realizado com as células sanguíneas da ascídia solitária.

Extração de proteínas e Western Blot

Para testar a especificidade do anticorpo CiYB1 contra a proteína YB1 da espécies *Styela canopus* e verificar os padrões de localização da proteína nas gônadas e também nos tecidos somáticos, foram dissecados espécimes para obtenção de gônadas, intestino, manto (da região dos sifões), além de um espécime que foi utilizado inteiro como controle e do sangue cujo procedimento de coleta foi anteriormente descrito. Cada um destes tecidos foram armazenados em microtubos de 1,5 ml a - 80° C até o momento da extração de proteínas. Para a extração, os tecidos foram descongelados e aos mesmos adicionou-se o tampão de extração RIPA de acordo com a quantidade de tecido. Os tecidos juntamente com o tampão de extração foram

macerados no próprio tubo, aquecidos a 60°C e sonicados a fim de melhorar a qualidade da extração; os extratos de proteína foram centrifugados a 15000 G a 4° por 15 minutos; ao sobrenadante adicionou-se corante Ponceau para verificar a qualidade da transferência após eletroforese. O gel de poliacrilamida foi imerso em tampão de corrida e submetido à eletroforese e as proteínas já separadas em suas respectivas bandas foram transferidas para membrana de celulose. A membrana foi bloqueada numa solução de PBST + leite a 4 % durante 2 horas, depois adicionou-se O ANTICORPO CiYB1 diluídos numa solução de PBST + leite a 5% na concentração de 1:500 conforme realizado por Tanaka e colaboradores (2004).Após incubação, as membranas foram lavadas com PBST (3 lavagens de 10 minutos cada) e foi adicionado o anticorpo secundário durante 2 horas. Por fim, realizaram-se mais 3 lavagens de PBST de 10 minutos cada, e adicionou-se substrato para reação de quimioluminescência e posterior revelação da membrana.

Histologia

Anteriormente ao início do procedimento de histologia, os animais foram limpos externamente para remoção do excesso de material orgânico, epibiontes e algas e mantidos durante 12 horas em água marinha filtrada para a remoção do conteúdo intestinal, a fim de reduzir a presença de artefatos nos cortes histológicos bem como a autofluorescência indesejável gerada em parte por algas unicelulares. Os animais foram fixados numa solução de água marinha filtrada com 4% de formaldeído, depois foram serialmente imersos em soluções de água marinha filtrada com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70% e 95%) durante 30 minutos cada, depois imersos em etanol 100% durante 2 horas para completa desidratação, em seguida em xileno 100% durante 1 hora, xileno 100% durante 1 hora a 60°C, xileno + parafina em iguais concentrações durante 1 hora a 60°C, depois em parafina a 100% a 60° C durante 24 horas. Posteriormente os animais foram emblocados e cortados em secções de 5 µm com micrótomo e aderidos em lâminas de microscopia com albumina + glicerina para auxiliar na aderência dos tecidos à lâmina e por fim foram armazenados em caixas de histologia à temperatura ambiente. Para reidratação dos cortes foi realizado todo o processo ao inverso: as lâminas foram mantidos em estufa a 60°C por pelo menos 30 minutos, depois foram imersas em xileno 100% durante 10 minutos, etanol 100% durante 10 minutos, serialmente imersos em soluções de água marinha filtrada com concentrações decrescentes de etanol (95%, 70%, 50% e 30%) durante 5 minutos cada e por fim em água destilada por 5 minutos. Para fins de análise

morfológica, os tecidos foram em seguida corados com o corante Azul de Alcian e analisados por microscopia de campo claro.

Imunohistoquímica

Para testar a especificidade do anticorpo CiYB1 contra a proteína YB1 das espécies aqui utilizadas bem como verificar os padrões de localização da proteína, cortes de ambos espécimes, *S. canopus* (ascídia solitária) e *S. rubra* (ascídia colonial) foram reidratrados, lavados com PBS (3 lavagens de 10 minutos cada), bloqueados numa solução de PBT + leite em pó a 5 % durante 2 horas e depois adicionou-se os anticorpo primário (Anti-CiBY1, produzido em coelho) diluídos em PBT em concentração de 1:500 conforme realizado por Tanaka e colaboradores (2004). Os tecidos foram incubados nos anticorpos primários durante 12 horas a 4°C, posteriormente lavados com PBT (3 lavagens de 10 minutos cada) e depois adicionou-se o anticorpo secundário Alexa 588, os quais foram incubados novamente durante 12 horas a 4°C. Por fim os cortes foram lavados em PBS (3 lavagens de 10 minutos cada), marcados com DAPI para visualização dos núcleos celulares (1 µl: 500 µl de PBS durante 2 minutos), lavados novamente com PBS (3 lavagens de 10 minutos cada), água destilada (1 lavagem de 10 minutos) e por fim adicionou-se glicerol a 100% e lamínula. Uma vez finalizada a imunohistoquímica, as lâminas foram armazenadas no escuro a 4°C e posteriormente analisadas com microscópio invertido de fluorescência Leica Dmi8 e microscópio confocal Leica CTR6 LED.

Resultados

Western blots realizados em extratos de diferentes tecidos indicam reação específica entre o anticorpo CiYB1 e a proteína YB1 do tunicado solitário *Styela canopus*

Com o objetivo de avaliar a presença da proteína YB1 em tecidos somáticos e germinativos da ascídia solitária bem como testar a especificidade do anticorpo CiYB1 produzido especificamente para a ascídia *Ciona* sp. contra a proteína YB1 de *Styela canopus*, realizaram-se extratos de proteína do manto (na região dos sifões), gônadas + saco branquial, intestino e células sanguíneas da hemocele além de um organismo que foi utilizado inteiro como controle (figura 1). Embora o cDNA de CiYB1 codifique

uma proteína de 320 aminoácidos e predição de peso molecular de 36,7 Kda, Tanaka e colaboradores (2004) observaram que a proteína codificada recombinante possuia uma mobilidade aparente de 55 Kda. No presente trabalho observaram-se bandas por volta de 55 Kda nos extratos de gônadas + saco branquial e também no controle, além de uma banda mais fraca do mesmo peso dos extratos de intestino. Tanaka e colaboradores também relataram a presença de uma banda fraca no intestino e no pâncreas de *Ciona* sp., embora os mesmo autores não relatam a presença da proteína nestes órgãos via imunohistoquímica. No presente trabalho foi obtido um resultado semelhante: observou-se uma banda fraca nos extratos de proteína do intestino porém não se verificou ao longo de toda a longitude do intestino por meio de microscopia confocal, se YB1 de fato se localiza em alguma região específica. Deste modo é possível que alguma região específica do intestino que ainda não foi analisada na microscopia confocal apresente um nicho de expressão de YB1, o que poderia explicar a presença da banda fraca verificada tanto no western blot do presente trabalho quanto por Tanaka e colaboradores (2004). A presença de bandas no controle e nas gônadas com peso molecular semelhante ao relatado na literatura sugerem que o anticorpo CiYB1 reconhece especificamente a proteína YB1 de *Styela canopus.*

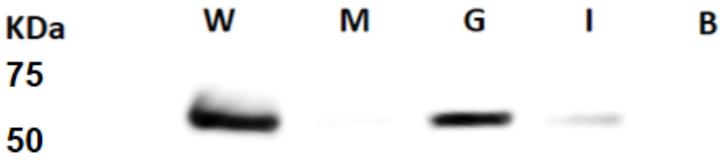

Figura 1

Ybox1 se localiza em tecidos germinativos da espécie solitária *Styela canopus*, predominantemente em células espermáticas

Após o teste de especificidade utilizando western blots, analisou-se os padrões de localização celular da proteína YB1 em diferentes tecidos somáticos (intestino, saco branquial, manto e células circulatórias da hemocele) e germinativos (ovário e testículos) da ascídia solitária *Styela canopus* (figura 2 e figura 3).

Os cortes histológicos submetidos à imunohistoquímica com o anticorpo primário CiYB1 e posteriormente analisados por microscopia confocal mostram que a proteína YB1 se localiza em todos os estágios de diferenciação das células que formam

os testículos (figura 2D), desde as células-tronco espermatogoniais até as espermátides, incluindo também os tipos intermediários (espermatócitos I e II) e em todos estes tipos celulares a presença de YB1 se deu principalmente no núcleo embora também tenha sido observada marcação na cauda das espermátides; este padrão de localização foi observado em todos os três espécimes do tunicado solitário *S. canopus* analisados (dados não mostrados). Observou-se também localização de YB1 em todo o citoplasma dos oócitos em diferentes estágios de diferenciação (figura 2B). Não observou-se presença de YB1 em nenhuma célula sanguínea (figura 2F), nem do manto (figura 2H), intestino (figura 2J) ou saco branquial (figura 2L). Portanto YB1 está presente em tecidos germinativos e ausente em todos os tecidos somáticos analisados.

A figura 2, figura 3 e figura 4 ilustram o padrão de localização de YB1 nas células que formam o testículos. Inesperadamente, os resultados aqui relatados são diferentes daqueles relatados por Tanaka e colaboradores (2004) e Wada e colaboradores (1998) que utilizaram a ascídia *Ciona* sp. como modelo; estes autores relatam marcação fraca nos testículos e forte marcação no oócitos. No presente trabalho observa-se marcação fraca nos oócitos e forte nos testículos de *S.canopus*. Portanto o padrão de localização celular de YB1 se mostrou diferentes em ambos as espécies de tunicados solitários.

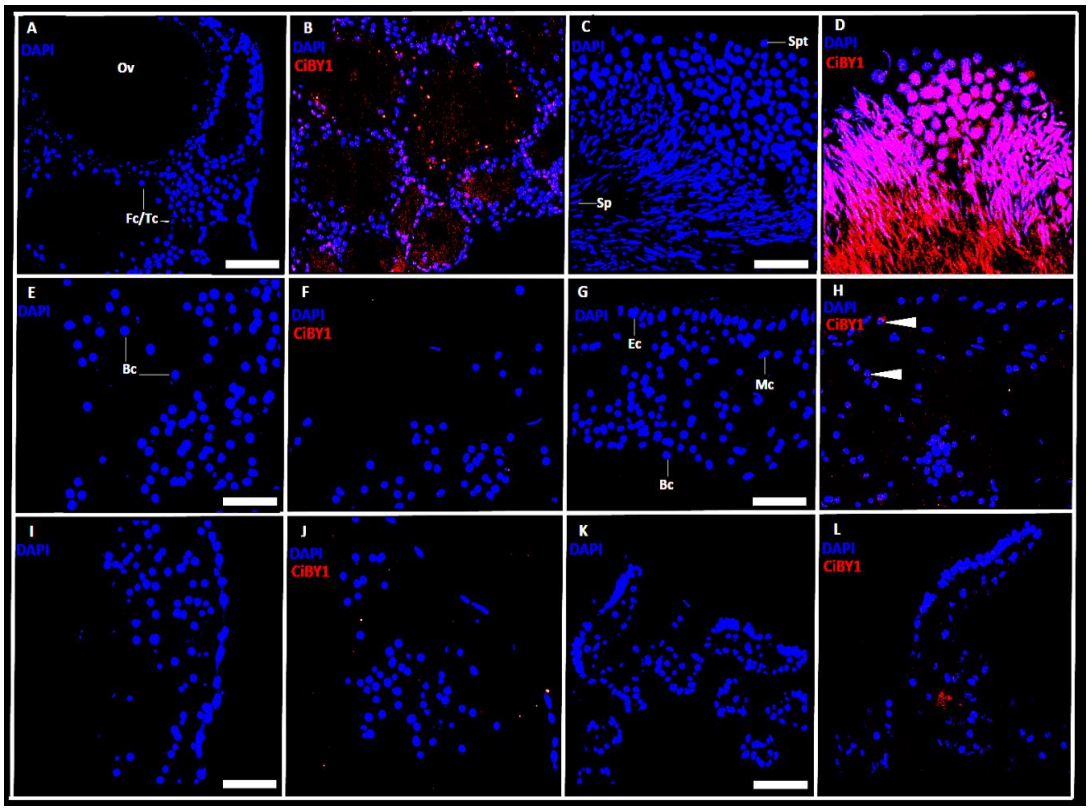

Figura 2: Secções histológicas em corte transversal da ascídia solitária *S. canopus* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (CiBY1); C: Testículo (controle); D: Testículo (CiBY1) (notar a forte marcação vermelha nos flagelos dos espermatozóides); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (CiBY1); G: Manto (controle); H: Manto (CiBY1); I: Intestino (controle); J: Intestino (CiBY1); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (CiBY1). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: 190 µm, C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

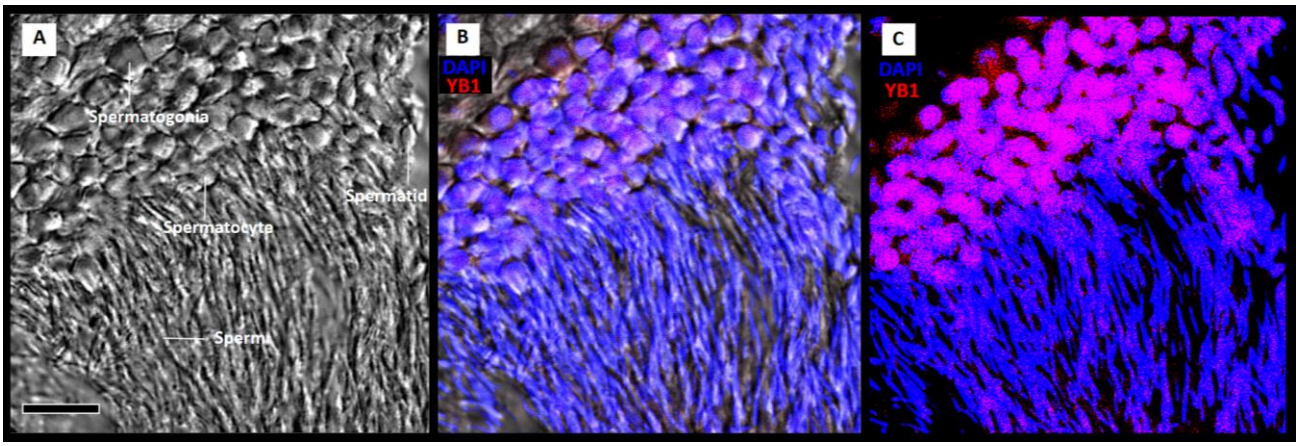

Figura 3: Secções histológicas em corte transversal do testículo da ascídia solitária *Styela canopus* submetidos à técnica de imunohistoquímica com o anticorpo CiYB1. A: micrografia em contraste diferencial de interferência (DIC); B: micrografia em DIC + DAPI (azul) marcando os núcleos celulares + YB1 (vermelho) marcando a preteína; C: micrografia de fluorescência mostrando os núcleos corados com DAPI (azul) e YB1 (vermelho). A sobreposição de DAPI e YB1 se observa na cor magenta. Barra de escala: 40 µm

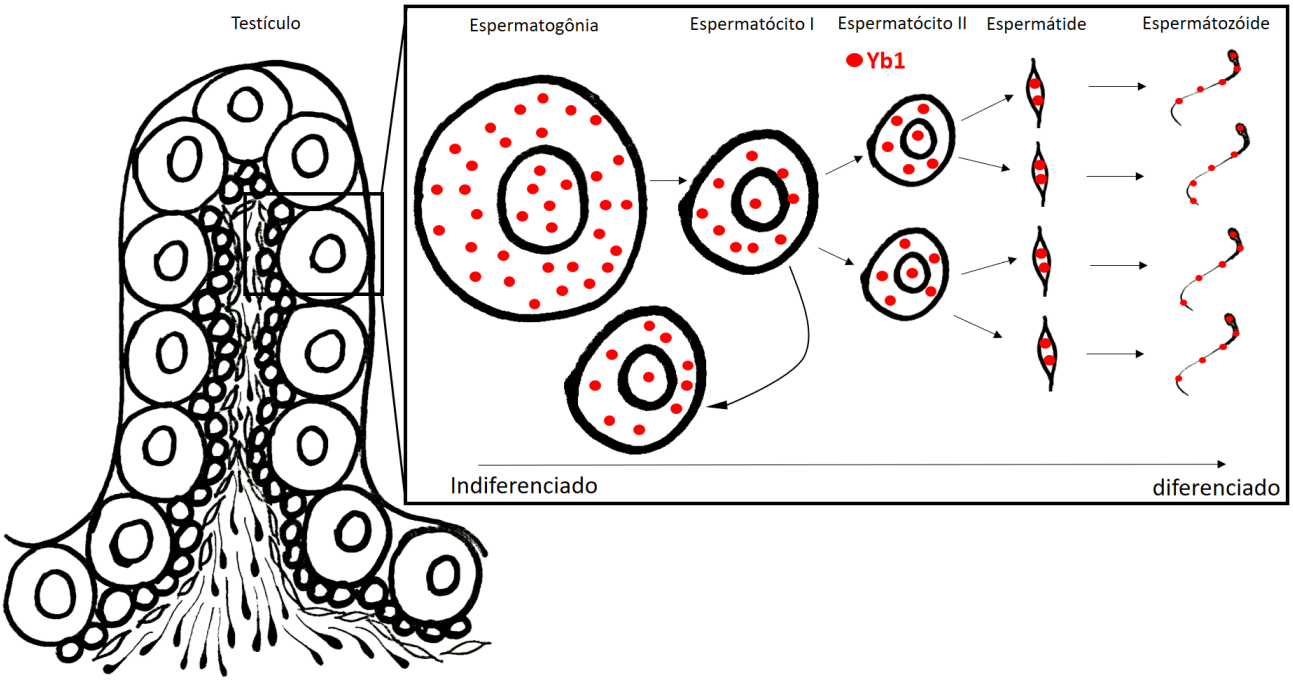

Figura 4: Ilustração esquemática da expressão de YB1 durante a espermatogênese da ascídia solitária *Styela canopus.* Os pontos vermelhos representam tipos celulares em que se observou localização da proteína YB1

A presença de YB1 no núcleo das células que formam o testículo e também no flagelo dos espermatozóides sugere que a proteína atua no controle da tradução de mRNAs diferentes, que agem em tempos e espaços diferentes do testículo; devido ´`a diversidade de funções que proteínas Y-box podem exercer é possível inclusive que a proteína esteja exercendo alguma outra função diferente do controle da tradução de mRNAs. Por outro lado, a mesma proteína também se mostrou presente no citoplasma de todos os tipos celulares relatados, inclusive nos flagelos dos espermatozóides, de modo que além de controlar a tradução de mRNAs diferentes, é possível que a mesma proteína atue de modos diferentes no núcleo e no citoplasma de um mesmo tipo celular. No sentido de corroborar as hipóteses aqui levantadas seria necessário outras metodologias como experimentos de knockdown ou knockout para verificar quais efeitos a inibição do mRNA *yb1* causa no fenótipo das células que formam o testículo.

YB1 se localiza apenas em tecidos germinativos da espécie *Symplegma rubra* (colonial)

Após o teste de especificidade utilizando western blots, analisou-se os padrões de localização celular da proteína YB1 em diferentes tecidos somáticos (intestino, saco branquial, manto e células circulatórias da hemocele, particularmente da vasculatura) e germinativos (ovário e testículos) da ascídia colonial *Symplegma rubra* (figura 5). O oócito mais maduro do único espécime analisado foi o único local de expressão observado (figura 5B); além do oócito, as células acessórias ao redor do mesmo (células foliculares ou células “test”) também apresentam YB1; a marcação do oócito se deu de forma desigual no citoplasma (a marcação se concentra mais no pólo vegetal e menos no pólo animal) enquanto nas células acessórias a marcação é nuclear (figura 5B). Não observou-se presença de YB1 em nenhuma célula sanguínea (figura 5F), nem do manto (figura 5H), intestino (figura 5J) ou saco branquial (figura 5L). Portanto YB1 está presente nos oócitos apenas e ausente em todos os tecidos somáticos analisados, além do testículo.

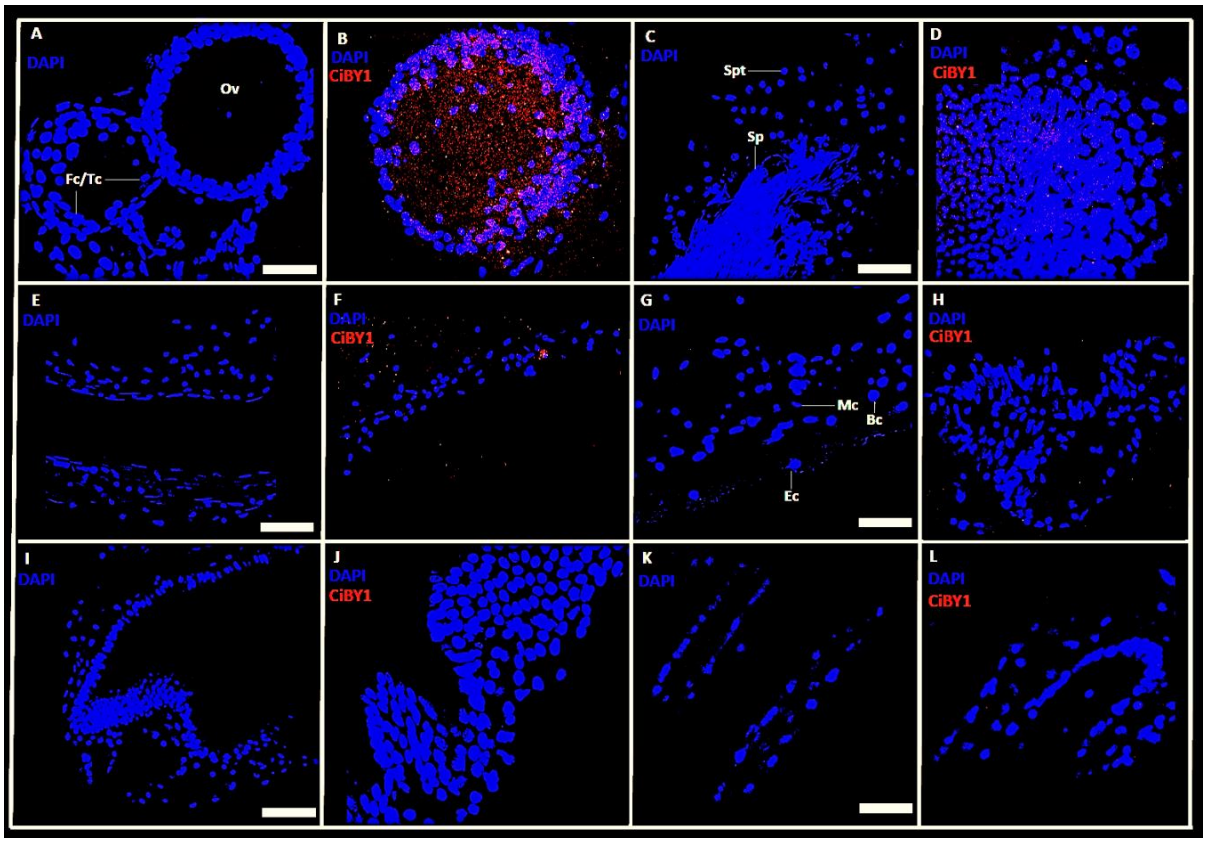

Figura 5: Secções histológicas em corte transversal da ascídia colonial *S. rubra* submetidos à técnica de imunocitoquímica. A: Ovário (controle); B: Ovário (CiBY1); C: Testículo (controle); D: Testículo (CiBY1); E: Células sanguíneas (controle); F: Células sanguíneas (CiBY1); G: Manto (controle); H: Manto (CiBY1); I: Intestino (controle); J: Intestino (CiBY1); K: Cesta branquial (controle); L: Cesta branquial (CiBY1). Abreviações: Ov: Ovócitos, Fc/Tc: Células foliculares/Células "test", Spt: Espermatócitos, Sp: Espermatozóides, Bc: Células do sangue, Célula epitelial, Mc:Célula muscular. Barras de escala: A-B: , C-D: 72 µm, E-H: 90 µm, I-L: 55 µm

A tabela 1 sumariza os padrões gerais de localização celular e subcelular de YB1 observados neste trabalho.

Tabela 1. Padrões de localização subcelular da proteína YB1 em tunicados

Tipo celular	Espécie analisada		
	Ciona intestinalis **(Tanaka et al., 2004; WADA et al., 1998)**	***Styela canopus***	***Symplegma rubra***
Espermatogônias	Marcação fraca nos testículos. Não se descreveu diferenças entre os tipos celulares do testículo	Marcação nuclear e citoplasmática	-
Espermatócitos		Marcação nuclear e citoplasmática	-
Espermátides		Marcação nuclear e citoplasmática	-
Espermatozóide		Marcação nuclear e citoplasmática, especialmente na cauda do espermatozóide	-
Epitélio ao redor do testículo	-	Marcação nuclear e citoplasmática	-
Células sanguíneas ao redor do testículo	-	-	-
Oogônia	Forte marcação citoplasmática com concentração maior no pólo vegetal	Fraca marcação citoplasmática	Forte marcação citoplasmática com concentração maior no pólo vegetal
Oócito	Fraca marcação citoplasmática com concentração maior no pólo vegetal	Fraca marcação citoplasmática	Não há dados
Células acessórias do oócito (células foliculares/células "test")	Não há dados	Marcação nuclear e citoplasmática	Marcação nuclear e citoplasmática
Tecidos somáticos	Intestino e pâncreas (observados via wesern blot)	Intestino (observado via western blot mas ausente na imunohistoquímica)	-

Discussão

As proteínas da família Y-box 1 podem apresentar inúmeras funções biológicas e em diferentes localizações, desde o núcleo e o citoplasma até mesmo funções fora da célula (ELISSEVA et al, 2011). A localização nuclear nas células-tronco espermatogoniais e espermatócitos ocorrendo concomitantemente com a marcação dos flagelos das células mais diferenciadas dos testículos sugere que YB1 pode estar regulando processos biológicos diferentes nestes tipos celulares, especialmente pela fato de que a presença de YB1 no núcleo e no citoplasma em associação com proteínas que compõem o citoesqueleto está bem descrita na literatura para outros modelos não tunicados (ELISSEVA et al, 2011). YB1 também pode apresentar funções de chaperona de RNAs (ELISSEVA et al, 2011) e até mesmo de regulação da transcrição (ELISSEVA et al, 2011). Portanto, com base na falta de evidências e na diversidade de funções que a proteína pode exercer, não é possível especular qual função a proteína apresenta e tampouco qual seria a relação entre os diferentes padrões observados com os modos de vida solitário e colonial. É possível especular também que exista algum plasma germinativo nos espermatozídes da solitária *S. canopus*. No sentido de validar tal explicação seria necessário analisar a localização de outras proteínas tipicamente presentes no plasma germinativo tais como Vasa, Nanos, Pem e Macho-1.

O presente trabalho avaliou os padrões de localização celular da proteína YB1 em tecidos somáticos e germinativos da ascídia solitária *Styela canopus* e da colonial *Symplegma rubra*. De encontro com observações realizadas em *Ciona* sp. descritas na literatura, as espécies aqui analisadas apresentam a proteína YB1 principalmente em tecidos germinativos, particularmente nos oócitos. Inesperadamente, a proteína se mostrou presente nas células germinativas dos testículos da solitária *S. canopus* e ausente nas mesma células da colonial *S. rubra*. Este resultado é inesperado porque os testículos de ambas são muito semelhantes em termos morfofuncionais. A diferença no padrão de localização da proteína nos testículos da solitária e da colonial por si não nos permite afirmar que tal diferença se dá devido aos modos de vida solitário e colonial uma vez que para tal seria necessária não apenas uma amostragem maior de tunicados solitários e coloniais como também uma metodologia que permita entender quais processos biológicos YB1 estaria regulando nas células germinativas do testículo da espécie solitária; neste sentido experimentos de knock-down e/ou knock-out poderiam

ser muito úteis para determinar os efeitos fenotípicos da inibição de *yb1* além de testes *in vitro* que também poderiam ajudar a determinar se YB1 sequestra algum mRNA específico da maquinaria de tradução ou se participa de algum outro processo biológico.

Conclusão

O anticorpo CiYB1 gerado especificamente para a ascídia *Ciona* foi testado quanto à sua especificidade na proteína YB1 de *S. canopus* e *S. rubra*, solitária e colonial, respectivamente. Os resultados obtidos através de western blot e imunohistoquímica + análise por microscopia confoncal demonstram que YB1 marca especificamente células germinativas das espécies aqui analisadas, demonstrando ser um bom marcador de células da linhagem germinativa. Conforme esperado, o anticorpo marcou a proteína YB1 dos oócitos de ambas espécies, solitária e colonial, porém marcou apenas as células germinativas dos testículos da solitária, desde as células-tronco espermatogoniais até as espermátides, porém a mesma proteína não foi observada nos mesmos tipos celulares da colonial, demonstrando que YB1 exerce alguma função ou funções na espermatogênese da solitária porém não na espermatogênese da colonial. As diferenças nos padrões de localização observadas podem ou não estar relacionadas aos modo de vida solitário e colonial, de modo que outros experimentos são necessários no sentido de investigar quais funções YB1 está exercendo.

Referências

BROWN, F.D,SWALLA, B.J. Evolution and development of budding by stem cells: Ascidian coloniality as a case study. Developmental Biology 369 (2012) 151–162. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.05.038

ELISEEVA et al.,Y Box Binding Protein 1 (YB1) and Its Functions. 2011, Vol. 76, No. 13, pp. 1402-1433. DOI: 10.1134/S0006297911130049

ERMAK, Thomas H. The Renewing Cell Populations of Ascidians Amer. Zool., 22:795-805 (1982)

Kumano G, Nishida H (2009) Patterning of an ascidian embryo along the anterior–posterior axis through spatial regulation of competence and induction ability by maternally localized PEM. Dev Biol 331:78–88. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.024

L. Ballarin, F. Cima Cytochemical properties of Botryllus schlosseri haemocytes: indications for morpho-functional characterisation European Journal of Histochemistry 2005; vol. 49 issue 3 (Jul-Sep): 255-264.

MATOVA, Nica & COOLEY, Lynn. Comparative Aspects of Animal Oogenesis. Developmental Biology 231, 291–320 (2001) DOI:10.1006/dbio.2000.0120

Nishida H, Sawada K (2001) Macho - 1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. Nature 409:724–729. DOI: 10.1038/35055568

Sardet C, Nishida H, Prodon F, Sawada K (2003) Maternal mRNAs of PEM and macho 1, the ascidian muscle determinant, associate and move with a rough endoplasmic reticulum network in the egg cortex. Development 130:5839–5849.DOI: 10.1242/dev.00805

SOLANA, Jordi. Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis. EvoDevo 2013, 4:2. DOI: 10.1186/2041-9139-4-2.

TANAKA et al., CiYB1 is a major component of storage mRNPs in ascidian oocytes: implications in translational regulation of localized mRNAs. Developmental Biology 272 (2004) 217– 230. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.032

Yajima M, Wessel GM. Essential elements for translation: the germline factor Vasa

functions broadly in somatic cells. Development. 2015 Jun 1;142(11):1960-70. doi: 10.1242/dev.118448. Epub 2015 May 14. PubMed PMID: 25977366; PubMed Central PMCID: PMC4460737.

WADA et al., An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryo. Develop. Growth Differ.(1998) 40, 631-640. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1998.t01-4-00007.x

WHITE-COOPER, Helen & BAUSEK, Nina. Evolution and spermatogenesis Phil. Trans. R. Soc. B (2010) 365, 1465–1480. DOI: 10.1098/rstb.2009.0323

Discussão geral e conclusões

O presente trabalho objetivou analisar os padrões de localização celular de proteínas de linhagem germinativa em tunicados solitários e coloniais do clado monofilético Styelidae. Uma vez que nas coloniais do clado *Botryllus* + *Symplegma* a expressão e localização de tais proteínas se dá nas gônadas mas também em outros tipos celulares fora das gônadas, o presente trabalho se propôs a realizar a primeira abordagem holística utilizando não somente dois modelos, um solitário (*Styela canopus*) cujo modo de vida se assemelha ao do ancestral de ambos solitário e colonial e outro colonial (*Symplegma rubra*) como também utilizando quatro proteínas que tem sido relatados na literatura como marcadores de linhagem germinativa em tunicados (Vasa, Piwi, PL10 e YB1).

A primeira hipótese inicial era encontrar células nas gônadas mas também fora das gônadas da colonial com presença de uma ou mais destas proteínas, conforme dados da literatura. De acordo com o esperado, encontramos células na vasculatura da colonial expressando as proteínas Vasa e Piwi, além de observar a presença de todas as quatro proteínas nas gônadas, também de acordo com o esperado. Além disso, existem relatos na literatura de que PL10 se expressa em tecidos somáticos da colonial e neste trabalho observou-se localização de PL10 em tecidos somáticos tais como saco branquial e intestino.

A segunda e mais importante hipótese a ser testada era que tais proteínas de linhagem geminativa se localizavam apenas nas gônadas da solitária, uma vez que a mesma apresenta apenas reprodução sexuada e não esperava-se encontrar tais proteínas em tecidos somáticos. Tal hipótese não pôde ser corroborada: inesperadamente observou-se células do sangue circulatórias na hemocele da solitária expressando as proteínas Vasa e Piwi. A primeira (e mais provável) explicação para tal observação é que na ascídia solitária *S. canopus* a proteína Piwi desempenha tambem outras funções somáticas, possivelmente relacionadas a outros processos do desenvolvimento (como por exemplo, regeneração), Vasa por sua vez pode estar desempenhando funções somáticas reportadas para outros modelos (YAJIMA & WESSEL, 2015). A segunda explicação é de que os anticorpos utilizados não são específicos e marcam outras proteínas das células do sangue da solitária; tal explicação é plausível umas vez que nos testes de especificidade por meio de western blots, o anticorpo Bl-Piwi reconheceu diversas proteínas e nenhuma delas era de tamanho esperado para Piwi enquanto que o anticorpo Bs-Vasa reconheceu a proteína de interesse mas também diversas outras.

O primeiro capítulo visa discutir ao resultados dos experimentos feitos para testar a primeira e segunda hipótese com vistas para um entendimento mais amplo dos processos de evolução da colonialidade que ocorreram no clado Styelidae. Ao menos dois eventos independentes de evolução da colonialidade ocorreram em Styelidae e conforme mencionado anteriormente, o ancestral das atuais espécies solitárias e coloniais do clado era um solitário. Existem ao menos dois diferentes modelos teóricos mais ou menos suportados por evidências experimentais para explicar a origem da colonialidade; o primeiro modelo afirma que em um provável ancestral solitário, uma ou algumas células células-tronco progenitoras se tornaram circulatórias, possibilitando assim o surgimento de brotos. O segundo modelo sugere que células precursoras já diferenciadas teriam sofrido reprogramação para se tornarem novamente células-tronco (BROWN & SWALLA, 2012). Apesar dos modelos propostos, admite-se que pode ter ocorrido na realidade uma contribuição de diferentes modelos que levaram à colonialidade; estes autores sugerem que o aumento do tamanho do ovócito associado com a ovoviviparidade facilitou o surgimento de rotas alternativas de diferenciação celular, favorecendo modificações no desenvolvimento que resultaram no surgimento de diferentes histórias de vida.

É possível especular também que *Styela canopus* esteja no início de um processo de evolução da colonialidade. Essa espécie do gênero é muito menor que as outras e tende a crescer sempre em agregados, ambas características de tunicados coloniais. Além disso a observação de células sanguíneas com expressão de proteínas de linhagem germinativa, uma vez confirmada por meio de outras metodologias, irá dar mais embasamento para tal especulação. A condição colonial fornece vantagem especialmente em mares tropicais nos quais a competição por espaço no subtrato marinho é intensa, uma vez que ascídias coloniais coloniais exploram ou dominam o substrato de forma mais eficiente que as solitárias (GREENE & CORESTS, 1983; JACKSON, 1987). Deste modo é possível que a condição colonial esteja emergindo ou irá emergir diversas em vezes no clado.

O segundo capítulo por sua vez visa analisar os padrões de localização celular e subcelular da proteína YB1 na solitária *S. canopus* e na colonial *S. rubra* com vistas para testar a seguinte hipótese de que se testículos e oócitos de ambas solitárias e coloniais são morfofuncionalmente semelhantes, é esperado que os perfis de expressão e localização celular de proteínas de linhagem germinativa também o sejam. Contrariando a hipótese inicial, YB1 se localiza em todas as células germinativas dos testículos da solitária mas não ocorrem no das coloniais. Apesar deste achado interessante, não é possível dizer quais funções YB1 estaria realizando nestes tipos celulares, embora seja possível especular que a proteína exerce funções diferentes em tipos celulares diferentes por se localizar tanto no núcleo das células-tronco espermatogôniais quanto nos caudas das espermátides; YB1 pode exercer uma dezena de funções diferentes (ELISSEVA et al., 2011) de modo que é plausível especular que nas células geminativas de *S. canopus* a proteínas exerça aos menos duas funções na manutenção desta linhagem celular enquanto nas coloniais atua apenas na oogêse.

O presente trabalho faz parte de um projeto maior (FAPESP 2015/50164-5) em colaboração com outro laboratório na França cujo objetivo em comum é compreender a evolução dos mecanismos moleculares que controlam os fenômenos morfológicos do brotamento, permitindo assim que tunicados do clado Styelidae apresentem capacidade de reprodução assexuada ocorrendo concomitante e indepdendentemente à reprodução sexuada bem como capacidade de regeneração de corpo inteiro.

Resumo (geral)

Tunicata é um grupo de cordados invertebrados marinhos com espécies solitárias e coloniais. Filogenias recentes sugerem que as espécies coloniais que se reproduzem sexuada e assexuadamente do clado *Botryllus* + *Symplegma* evoluíram de um ancestral solitário que se reproduzia apenas sexualmente. As Células-Tronco Germinativas (GSCs) estão localizadas nas gônadas mas também no sistema circulatório das ascídias botrillídeas coloniais existentes. Vasa, Piwi, PL10 e YB1 são marcadores que foram previamente utilizados na identificação de GSCs de ascídias. O objetivo deste trabalho é comparar a ocorrência de GSCs na ascídia solitária *Styela canopus* e na ascídia colonial *Symplegma rubra*, que representam dois táxons relativamente próximos aos botrillídeos na filogenia. Utilizando anticorpos que se ligam especificamente a proteínas da linhagem germinativa gerados para outras espécies de ascídias, validamos sua especificidade para as espécies de interesse (*Styela canopus* e *Symplegma rubra*) por western blot e realizamos imunohistoquímica em cortes histológicos dessas espécies. De acordo com as expectativas, observamos expressão de Vasa e Piwi em oócitos e expressão de PL10 e YB1 em ambos oócitos e testículos. Nós documentamos células Vasa e Piwi positivas no sistema circulatório da ascídia colonial *S. rubra*, como mostrado anteriormente para botrillídeos. Entretanto, também observamos poucas células positivas para Vasa e Piwi no sistema circulatório da solitária *S. canopus* em pelo menos um tipo de célula sangüínea, e em outras células somáticas do intestino, manto e do saco branquial. A presença destas proteínas de linhagem germinativa em outros tipos celulares fora das gônadas de ascídias solitárias, permite supor que: (1) as células positivas podem representar tipos celulares indiferenciados (relacionados a GSCs) envolvidos em outros processos do desenvolvimento (por exemplo, regeneração) ou (2) essas proteínas que se expressam em GSCs adquiriram funções em células somáticas de *S. canopus* que permanecem desconhecidas. De encontro com relatos da literatura para a ascídia modelo *Ciona* no presente trabalho observou-se também a presença de YB1 nos oócitos de ambas solitária e colonial, entretanto YB1 estava presente nas células germinativas do testículo apenas da solitária *S. canopus*. Embora não seja possível determinar quais funções a proteína estaria exercendo nas células germinativas do testículo, é possível especular que a mesma proteína exerça funções diferentes em tipos celulares diferentes, devido aos padrões de localização celular e subcelular e também à diversidade de funções que a proteína pode exercer.

Palavras-chave: Tunicado, solitário, colonial, somático, germinativo

Abstract (general)

Tunicata is a group of marine invertebrate chordates with solitary and colonial species. Recent phylogenies suggest that the colonial species of the Botryllus + Symplegma clade with both sexually and asexually reproduction capabilities evolved from a solitary, sexually reproducing ancestor. Germ Stem Cells (GSCs) are located in the gonads but also in the cells outside gonads of extant colonial botryllid ascidians. Vasa, Piwi, PL10 and YB1 are markers that were previously used to identify GSCs in ascidian. Our objective is to compare the occurrence of GSCs in the solitary ascidian *Styela canopus* and in the colonial *Symplegma rubra*, which represent two taxa relatively close to botryllids in the phylogeny. Using antibodies that specifically bind to germline proteins generated for other species of ascidians, we validate their specificity for the species of interest (*Styela canopus* and *Symplegma rubra*) using western blot and immunohistochemistry on histological sections of these species. According to expectations, we observed Vasa and Piwi expression in oocytes and PL10 and YB1 expression in both oocytes and testes. We have documented positive Vasa and Piwi cells in the circulatory system of the colonial *S. rubra*, as previously shown for botryllids. However, we also observed some Vasa and Piwi-positive cells in the hemocoel of solitary *S. canopus* in at least one blood cell type, and in other somatic tissues like gut, mantle and branchial sac. The presence of these germline proteins in cell types outside gonads of solitary *S. canopus* suggests that: (1) positive cells may represent undifferentiated (GSC-related) cell types involved in other developmental processes (e.g. regeneration) or (2) these GSC-expressing proteins have acquired functions in *S. canopus* somatic cells that remain unknown. According to literature reports for *Ciona*, we also observed the presence of YB1 in both solitary and colonial oocytes, however YB1 was present only in germ cells in the testis of the solitary *S. canopus*. Although the expression patterns reported here in the testes do not allow us to determine the function of YB1 in spermatogenic cells, it is possible to speculate that YB1 plays a role as RNA chaperone or in the regulation of translation during spermatogenesis.

Keywords: tunicate, solitary, colonial, somatic, germ

Referências

ALIÉ et al., Convergent acquisition of nonembryonic development in styelid ascidians. Mol Biol Evol. 35(7):1728-1743 (2018). DOI: 10.1093/molbev/msy068.

BROWN et al., Whole Body Regeneration in a Colonial Ascidian, Botrylloides violaceus. JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY (MOL DEV EVOL) 312B:885–900 (2009). DOI: 10.1002/jez.b.21303

BROWN, F.D,SWALLA, B.J. Evolution and development of budding by stem cells: Ascidian coloniality as a case study. Developmental Biology 369 (2012) 151–162. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.05.038

BROWN et al., Early lineage specification of long-lived germline precursors in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri.* Development 136, 3485-3494 (2009) doi:10.1242/dev.037754

DELSUC et al., A phylogenomic framework and timescale for comparative studies of tunicates. BMC Biology (2018) 16:39. DOI: https://doi.org/10.1186/s12915-018-0499-2

GREENE, Charles H, CORETS. Sucession on marine hard substrata: the adaptative significance of solitary and colonial strategies in temperate fouling communities. Marine Ecology – Progress series. Vol. 13: 121-129, 1983.

JACKSON, J.B.C. Competition on marine hard substrata: the adaptative significance of solitary and colonial strategies; vol 111, n. 980, The American Naturalist, July-August, 1977

KASAS O.M. (1940) Structure of the larvae of ascidians, *Dendrodoa grossularia* and their metamorphosis. Bull Acad Sci USSR Biol 1940, pp 862–883

KASSMER, S. H. et al. Migration of germline progenitor cells is directed by sphingosine-1-phosphate signalling in a basal chordate. Nat. Commun.6:8565 doi: 10.1038/ncomms9565 (2015).

KAWAMURA, Kaz, SUNANAGA, Hemoblasts in colonial tunicates: Are they stem cells or tissue-restricted progenitor cells? Develop. Growth Diffe**r**. (2010) 52, 69–76. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009. 01142.x

KOCOT et al., Phylogenomics offers resolution of major tunicate relationships. Molecular Phylogenetics and Evolution 121 (2018) 166–173. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.01.005

LANGENBACHER & DE TOMASO. Temporally and spatially dynamic germ cell niches in *Botryllus schlosseri* revealed by expression of a TGF-beta family ligand and *vasa* EvoDevo *(2016) 7:9* DOI 10.1186/s13227-016-0047-5

NIEUWKOOP, Pieter D, SUTASURYA, Lien A. Primordial Germ Cells in the invertebrates: From Epigenesis to preformation. Volume 10, Developmental and Cell Biology Series, CUP Archive, 1981

Shenkar, N.; Gittenberger, A.; Lambert, G.; Rius, M.; Moreira da Rocha, R.; Swalla, B.J.; Turon, X. (2019). Ascidiacea World Database. Accessed at http://www.marinespecies.org/ascidiacea on 2019-07-31. doi:10.14284/353

SOLANA, Jordi. Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis. EvoDevo 2013, 4:2. DOI: 10.1186/2041-9139-4-2.

STOLFI & BROWN. Book chapter: Tunicata. In Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 6: Deuterostomia. Editor Andreas Wanninger (University of Vienna, Austria) (2015). Springer, Wien. DOI: 10.1007/978-3-7091-1856-6_4

SUNANAGA, Takeshi, INUBUSHI, Hironori & KAWAMURA, Kazuo. Piwi-expressing hemoblasts serve as germline stem cells during postembryonic germ cell specification in colonial
ascidian, Botryllus primigenus Develop. Growth Differ. (2010) 52, 603–614. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01196.x

RINKEVICH et al., Piwi positive cells that line the vasculature epithelium, underlie whole body regeneration in a basal chordate, Developmental Biology 345 (2010) 94–104. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.05.500

ROSNER, Amalia, PAZ, Guy & RINKEVICH, Baruch Divergent Roles of the DEAD-Box Protein BSPL10, the Urochordate Homologue of Human DDX3 and DDX3Y Proteins, in Colony Astogeny and Ontogeny. DEVELOPMENTAL DYNAMICS 235:1508–1521, 2006. DOI: 10.1002/dvdy.20728

ROSNER et al., Vasa and the germ line lineage in a colonial urochordate. Developmental Biology 331 (2009) 113–128. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.04.025

TANAKA et al., CiYB1 is a major component of storage mRNPs in ascidian oocytes: implications in translational regulation of localized mRNAs. Developmental Biology 272 (2004) 217– 230. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.032