

**JENYFFER MAIRELY ROSERO ALPALA**

**Rastreabilidade *in vivo* de células germinativas primordiais do  
bagre-sapo *Pseudopimelodus mangurus***

São Paulo

2023

JENYFFER MAIRELY ROSERO ALPALA

**Rastreabilidade *in vivo* de células germinativas primordiais do bagre-sapo  
*Pseudopimelodus mangurus***

**VERSÃO CORRIGIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**  
Reprodução Animal

**Área de concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Dr. George Shigueki Yasui

São Paulo - SP

Março de 2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4294  
FMVZ

Rosero Alpala, Jenyffer Mairely  
Rastreabilidade *in vivo* de células germinativas primordiais do bagre-sapo  
*Pseudopimelodus mangurus* / Jenyffer Mairely Rosero Alpala. – 2023.  
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui.

1. Conservação. 2. Desenvolvimento inicial. 3. Banco de genes. 4. Peixes neotropicais.  
5. PGC. I. Título.



**MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE**  
**INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Rodovia SP-201 (Pref. Euberto Nemésio Pereira de Godoy), Km 6,5, - Bairro , Caixa Postal 64 - Pirassununga - CEP 13.630-970

Telefone:  
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Rastreabilidade in vivo de células germinativas primordiais do bagre-sapo *Pseudopimelodus mangurus*", registrada com o nº 02031.000114/2022-31 sob a responsabilidade de George Shigueki Yasui - USP e ICMBio/CEPTA - e pesquisadora Jenyffer Mairely Rosero Alpala - USP, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº [11.794](#), de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº [6.899](#), de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEUA/CEPTA), em reunião de 27/10/2022.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/04/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Pseudopimelodus mangurus</i> (Bagre-sapo), <i>Prochilodus lineatus</i> (Curimatá) e <i>Astyanax altiparanae</i> (Lambari do rabo amarelo)
Nº de animais	<i>Pseudopimelodus mangurus</i> -16 <i>Prochilodus lineatus</i> - 08 <i>Astyanax altiparanae</i> - 50.
Peso/Idade	10g - 1,2kg – 1 ano
Sexo	sem distinção
Origem	pantel do CEPTA

Pirassununga, 27 de outubro de 2022

**MARIA RITA DE CÁSCIA BARRETO NETO**

Analista Ambiental

Coordenadora da CEUA/CEPTA



Documento assinado eletronicamente por **Maria Rita de Cascia Barreto Netto**, **Analista Ambiental**, em 27/10/2022, às 16:30, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.icmbio.gov.br/autenticidade> informando o código verificador **12869592** e o código CRC **2DE24B53**.



*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 08 de dezembro de 2022  
CEUAx N 3595161122

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: George Shigueky Yasui

Área: Reprodução Animal

Equipe envolvida: Giselle Pesanha Pessoa - (colaborador); Jemyffer Mairely Rosero Alpala - (executante); Paulo Sérgio Monzani - (colaborador);

Título da proposta: "Rastreabilidade in vivo de células germinativas primordiais do bagre-sapo *Pseudopimelodus mangurus*".

**Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 07/12/2022, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROSERO, Jenyffer Mairely

Título: **Rastreabilidade *in vivo* de células germinativas primordiais do bagre-sapo *Pseudopimelodus mangurus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Para minha família, minha mãe Maria Celida (*in memoriam*), meu pai Segundo Florentino, meus irmãos Olga, Alicia, Gladis, Jaime, Amparo e Deisy, por serem a minha inspiração e meu suporte.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me guiar e acompanhar durante essa trajetória.

Ao Dr. George Shigueki Yasui pela orientação e suporte para desenvolver o projeto no Laboratório de Biotecnologia de Peixes.

Ao Dr. Paulo Sergio Monzani pelo assessoramento técnico e intelectual.

Ao Dr. José Augusto Senhorini, pela ajuda, confiança e pelo suporte constante na realização deste projeto

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Peixes, Amanda, Gabriella, Giselle, Gustavo, Lucia, Andreolli, Nathalia, Rafaela e Leticia, por todas os ensinamentos dentro e fora do laboratório. Aprendi muito com vocês.

De maneira especial agradeço a Giselle pelo apoio, paciência e pela amizade que dia com dia foi construída.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (ICMBio/CEPTA), em nome do coordenador do Laboratório de Biotecnologia de Peixes Analista Ambiental Cláudio Cazal de Araújo Lira Filho pelo fornecimento das instalações para manutenção dos peixes pelo fornecimento das instalações para manutenção dos peixes.

A todos os funcionários e colaboradores do CEPTA.

A AES Tiete pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

A Universidade de São Paulo, com os professores e administrativos, pela oportunidade estudos e pesquisa.

A todos que de alguma maneira colaboraram para realização deste trabalho. Muito obrigada

## RESUMO

ROSETO ALPALA J. M. **Rastreabilidade *in vivo* de células germinativas primordiais do bagre-sapo *Pseudopimelodus mangurus***. 2023. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2023.

O bagre sapo *Pseudopimelodus mangurus* é um peixe siluriforme distribuído na bacia do rio Prata, cuja população vem se esgotando na última década. Estratégias de conservação e manutenção da diversidade genética tornam-se então necessárias, como o criobanco e a produção de quimeras germinativas por meio do transplante de células germinativas primordiais (PGCs). O objetivo deste trabalho foi estabelecer um procedimento para rastreabilidade de PGCs de bagre sapo, utilizando as regiões 3'-UTR de mRNAs endógenos *ddx4* e *dnd1* a fim de sintetizar mRNA artificial (*gfp-Pm-ddx4 3'UTR/ DsRed -Pm-ddx4 3'UTR*) e então injetados em zigotos (1 célula) de *P. mangurus*. Além disso, o mesmo mRNA foi utilizado em espécies Characiformes (*Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*) para verificar a aplicação em outras espécies. Os genes *ddx4* e *dnd1* foram escolhidos como marcadores, considerando sua expressão durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos larvais e adultos de *P. mangurus*. Células GFP ou DsRed positivas (presumíveis PGCs) foram observadas pela primeira vez por fluorescência em *P. mangurus* na fase de segmentação com 28 somitos, na fase gástrula com 70% de epibolia em *A. altiparanae* e segmentação com 6 somitos em *P. lineatus*. A porcentagem de marcação em embriões de *P. mangurus* (n = 521) foi de 3%, em *A. altiparanae* (n = 512) foi de 29%, em *P. lineatus* (n = 253) foi de 16%. A visualização de PGCs em *P. mangurus* foi possível apenas quando mRNA contendo o repórter DsRed foi usado. A sobrevivência embrionária foi de  $12,2 \pm 1,8\%$  ( $p = 0,0006$ ) em *P. mangurus*. No experimento de expressão gênica semiquantitativa, verificou-se a expressão de *ddx4* e *dnd1* apenas no desenvolvimento embrionário e nas gônadas, desde a fase de zigoto até a blástula, diminuindo a intensidade das bandas na gástrula com 50% de epibolismo e clivagem, mas a expressão ainda foi observada na fase de eclosão. Em tecidos adultos, *ddx4* foi expresso em testículo e ovário, enquanto *dnd1* foi expresso apenas em ovário. Os resultados indicaram que a marcação de PGCs em outras espécies foi mais eficiente do que em *P. mangurus*, sugerindo que existem problemas intrínsecos para a visualização de PGCs nesta espécie, principalmente antes da eclosão. Os dados acima permitem, pela primeira vez na literatura, a rastreabilidade *in vivo* de PGCs no bagre sapo e espécies de Characiformes usando *ddx4 3'UTR* de uma espécie Neotropical. Os resultados obtidos neste estudo podem ser aplicados para produzir quimeras germinativas como uma ação conservacionista e estabelecimento de criobancos para *P. mangurus*.

Palavras-chave: Conservação, Desenvolvimento inicial, Banco de genes, Peixes neotropicais, PGC.

## ABSTRACT

ROSETO ALPALA J. M. ***In vivo* traceability of primordial germ cells of the marbled catfish *Pseudopimelodus mangurus***. 2023. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2023.

The marbled catfish *Pseudopimelodus mangurus* is a Siluriform fish distributed in the Prata river basin in which population is being depleted in the last decade. Strategies for the conservation and maintenance of genetic diversity becomes then necessary, such as cryobanking and the production of germline chimeras through transplantation of primordial germ cells (PGCs). The objective of this work was to establish a procedure for traceability of PGCs from marbled catfish, using to the 3'-UTR regions of mRNAs of endogenous *ddx4* and *dnd1* in order to synthesize artificial mRNA (*gfp-Pm-ddx4* 3'UTR/ *Dsred-Pm-ddx4* 3'UTR) and then injected into zygotes (1 cell) of *P. mangurus*. In addition, the same mRNA was used in Characiform species (*Astyanax altiparanae* and *Prochilodus lineatus*) to verify the application in other species. The *ddx4* and *dnd1* genes were chosen as markers, considering their expression during embryonic development and in larval and adult *P. mangurus* tissues. GFP or DsRed positive cells (presumptive PGCs) were observed for the first time by fluorescence in *P. mangurus* at segmentation phase with 28 somites, in the gastrula phase with 70% epiboly in *A. altiparanae* and segmentation with 6 somites in *P. lineatus*. The percentage of marking in *P. mangurus* embryos (n = 521) was 3%, in *A. altiparanae* (n = 512) it was 29%, in *P. lineatus* (n = 253) it was 16 %. Visualization of PGCs in *P. mangurus* was feasible only when mRNA containing the DsRed reporter was used. The embryo survival was  $12.2 \pm 1.8\%$  ( $p = 0,0006$ ) in *P. mangurus*. In the semiquantitative gene expression experiment, the expression of *ddx4* and *dnd1* was verified only in the embryonic development and in the gonads, from the zygote to the blastula stages, decreasing the intensity of the bands in the gastrula with 50% of epibolism and cleavage, but expression was still observed in the hatching phase. In adult tissues, *ddx4* was expressed in testis and ovary, while *dnd1* was expressed only in ovary. The results indicated that the marking of PGCs in other species was more efficient than in *P. mangurus*, suggesting that there are intrinsic problems for the visualization of PGCs in this species, especially before hatching. The above data allow, for the first time in the literature, the *in vivo* traceability of PGCs in marbled catfish and Characiformes species using *ddx4* 3'UTR from a Neotropical species. The results obtained in this study could be applied to produce germline chimera as a conservationist action and establishment of cryobanks for *P. mangurus*.

Keywords: Conservation, Early development, Genebanking, Neotropical fish, PGC.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Rotas migratórias de PGCs <i>in vivo</i> nas principais espécies neotropicais usando o marcador <i>nos1</i> 3'UTR de peixe zebra .....	20
Figura 2- Distribuição dos transcritos de <i>nanos3</i> durante a embriogênese de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> usando a sonda antisense de RNA de <i>nanos3</i> de bagre sapo .....	21
Figura 3- Amplificação da região 3'UTR de <i>ddx4</i> e 3'UTR de <i>dnd1</i> utilizando cDNA da gônada de fêmea como molde. Visualização em gel de agarose a 1%. .....	44
Figura 4- Amplificações da região 3'UTR de <i>ddx4</i> clonada no vetor pGEM-T easy (pGEM-T- <i>ddx4</i> 3'UTR), visualizadas em gel de agarose a 1%. .....	44
Figura 5- Alinhamento das sequências de nucleotídicas da região 3'UTR de <i>ddx4</i> obtidas pelo sequenciamento, utilizando os primers SP6 e T7, com a sequência oriunda do transcrito do ovo de bagre sapo, utilizando o programa MultAlin.....	45
Figura 6- Alinhamento múltiplo da região 3'UTR de <i>ddx4</i> de <i>P. Mangurus</i> com a mesma região de outras espécies. ....	46
Figura 7- Visualização dos vetores clivados pPSP64-gfp e pGEM-T-Pm- <i>ddx4</i> 3'UTR. Clivados com as enzimas de restrição XbaI e EcoRI, observados em gel de agarose a 1%. .....	47
Figura 8- Mapa de restrição do vetor de transcrição pSP64-gfp-Pm- <i>ddx4</i> 3'UTR após a clivagem com XbaI, HindII e EcoRI. Visualizado em UV, em gel de agarose a 1%......	47
Figura 9- Mapa dos vetores de transcrição construídos com o inserto de 3'UTR de <i>ddx4</i> ......	48
Figura 10- Início da expressão dos genes repórter e visualização de PGCs <i>in vivo</i> durante o desenvolvimento embrionário de <i>P. mangurus</i> , pela microinjeção do mRNA sintético <i>DsRed-Pm-ddx4</i> 3'UTR, sob estereomicroscópio em luz normal e fluorescência.....	51
Figura 11- Visualização de PGCs <i>in vivo</i> em larvas de <i>P. mangurus</i> após a eclosão e no primeiro dia após a eclosão, pela microinjeção do mRNA sintético <i>DsRed-Pm-ddx4</i> 3'UTR, sob estereomicroscópio em luz normal e fluorescência .....	52
Figura 12- Início da visualização de PGCs em larvas de <i>A. altiparanae</i> e <i>P. lineatus</i> pela microinjeção do mRNA <i>gfp-pm-ddx4</i> 3'UTR, sob estereomicroscópio com fluorescência. ....	54
Figura 13- Diferenças na intensidade de fluorescência (GFP/DsRed) nas PGCs de <i>P. mangurus</i> , <i>P. lineatus</i> e <i>A. altiparanae</i> durante a eclosão. Embriões microinjetados com os mRNAs <i>gfp-Pm-ddx4</i> 3'UTR e <i>DsRed-Pm-ddx4</i> 3'UTR, sob fluorescência .....	55
Figura 14- Duração da intensidade de fluorescência nas PGCs em larvas de <i>P. mangurus</i> , <i>P. lineatus</i> e <i>A. altiparanae</i> a partir do 1 dpe até a desaparecimento da fluorescência. Embriões microinjetados com os mRNAs <i>gfp-Pm-ddx4</i> 3'UTR e <i>DsRed-pm-ddx4</i> 3'UTR, sob estereomicroscópio em luz normal e fluorescência.....	56

Figura 15- Número médio PGCs-Dsred positivas de <i>P. mangurus</i> , e PGCs-GFP positivas de <i>A. altiparane</i> e <i>P. lineatus</i> marcados pela microinjeção de mRNA sintético, durante o desenvolvimento embrionário até a fase larval. Embriões e larvas mantidos a 25°C. .....	58
Figura 16- Amplificação de <i>dnd1</i> , <i>ddx4</i> e <i>actb</i> a partir do cDNA de amostras do desenvolvimento embrionário de <i>P. mangurus</i> , visualizadas em gel de agarose a 2%......	62
Figura 17- Eletroforese da amplificação de <i>dnd1</i> , <i>ddx4</i> e <i>actb</i> em tecidos de fêmea e macho de <i>P.mangurus</i> em gel de agarose de 2%......	63
Figura 18- Alinhamento múltiplo dos aminoácidos de <i>Ddx4</i> de <i>P. mangurus</i> , <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> , <i>Ictalurus punctatus</i> , <i>Rhamdia quelen</i> , <i>Astyanax mexicanus</i> .....	64
Figura 19- Alinhamento múltiplo dos aminoácidos de <i>Dnd1</i> de <i>P. mangurus</i> , <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> , <i>Ictalurus punctatus</i> , <i>Tachysurus fulvidraco</i> , <i>Astyanax mexicanus</i> .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências dos primers desenhados para amplificação das regiões codificantes e 3'UTR de <i>dnd1</i> e <i>ddx4</i> , e para a construção dos vetores de transcrição. ....	35
Tabela 2- Porcentagem de embriões com PGCs marcadas pela microinjeção de mRNA sintético durante o desenvolvimento embrionário de <i>A. altiparanae</i> , <i>P. lineatus</i> e <i>P. mangurus</i> .....	60
Tabela 3- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de <i>P. mangurus</i> , microinjetados com <i>dsred-Pm-ddx4</i> 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Characin. Os controles com córion (CCC) e sem córion (CSC) mantidos nas mesmas condições.....	60
Tabela 4- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de <i>P. mangurus</i> , microinjetados com <i>gfp-Pm-ddx4</i> 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Characine. Os controles com corion (CCC) e sem corion (CSC) mantidos nas mesmas condições.....	61
Tabela 5- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de <i>A. altiparanae</i> , microinjetados com <i>gfp-Pm-ddx4</i> 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Holtfreter. Os controles com córion (CCC) e sem córion (CSC) mantidos nas mesmas condições.....	61
Tabela 6- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de <i>P. lineatus</i> microinjetados com <i>gfp-pm-ddx4</i> 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Characin. Os controles com córion (CCC) e sem córion (CSC) mantidos nas mesmas condições.....	61

## LISTA DE ABREVIações

dpf	Dias após a fertilização
DsRed	Red fluorescent protein (proteína vermelha fluorescente)
GFP	Green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
hpe	Horas após a eclosão
hpf	Horas após a fertilização
mRNA	Messenger Ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)
pb	Pares de bases
PGC	Primordial germ cell (célula germinativa primordial)
UTR	Untranslated region (região não traduzida)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 HIPOTESE.....	23
2.2 OBJETIVO GERAL .....	23
2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>24</b>
3.1 <i>Pseudopimelodus mangurus</i> .....	24
3.2 CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS .....	25
<b>3.2.1 Especificação de PGCs .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2 Migração de PGCs .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.3 Colonização.....</b>	<b>28</b>
3.3 MARCADORES CELULARES .....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 INDUÇÃO HORMONAL, COLETA DE GAMETAS E FERTILIZAÇÃO .....	31
<b>4.1.1 Bagre sapo .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.2 Espécies controle para avaliação de mRNA sintético .....</b>	<b>32</b>
4.2 COLETA DE AMOSTRAS E TECIDOS PARA AVALIAÇÕES MOLECULARES .. .....	33
4.3 EXTRAÇÃO DE mRNA DAS AMOSTRAS COLETADAS.....	34
4.4 DESENHO DE PRIMERS.....	34
4.5 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES NÃO TRADUZIDAS (3'UTR) DE <i>ddx4</i> E <i>dnd1</i> .....	35
4.6 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES 3'UTR CLONADAS .....	37
4.7 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE TRANSCRIÇÃO .....	37
4.8 SÍNTESE DE mRNA <i>in vitro</i> .....	38
4.9 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES CELULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE PGCs <i>in vivo</i> .....	39

4.9.1	Microinjeção de mRNA em zigotos de <i>P. mangurus</i> e espécies controle	39
4.9.2	Identificação de PGCs <i>in vivo</i> no desenvolvimento embrionário de <i>P. mangurus</i> e espécies controle	40
4.9.3	<i>Ddx4</i> 3'UTR de bagre sapo como marcador de PGCs nas espécies neotropicais	40
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SEMI-QUANTITATIVA E TECIDO ESPECIFICA DE <i>ddx4</i> E <i>dnd1</i>	41
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5.	<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
5.1	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES 3'UTR DE <i>ddx4</i> E <i>dnd1</i>	43
5.2	SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES CLONADAS	45
5.3	CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE TRANSCRIÇÃO COM AS REGIÕES 3'UTR DE <i>ddx4</i>	46
5.4	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES CELULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE PGCs <i>in vivo</i>	49
5.4.1	Identificação de PGCs <i>in vivo</i> no desenvolvimento embrionário de <i>P. mangurus</i>	49
5.4.2	<i>Ddx4</i> 3'UTR de bagre sapo como marcador de PGCs nas espécies neotropicais	52
5.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SEMI-QUANTITATIVA E TECIDO ESPECIFICA DE <i>ddx4</i> E <i>dnd1</i>	62
6.	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
7.	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
8.	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>71</b>
9.	<b>REFERENCIAS</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 400 novas espécies de peixes de água doce são descritas no mundo a cada década (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005). Atualmente, cerca de 33.000 espécies de peixes continentais de águas doces foram descritas, das quais 24% estão distribuídos na região neotropical (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020). Na América do Sul, mais de 104 novas espécies de água doce são identificadas anualmente, sendo descritas até o momento 4.475 espécies, das quais 74% são classificadas nas ordens Characiformes (1.700 espécies), Gymnotiformes (212 espécies) e Siluriformes (2.328 espécies), sendo 21% dessas espécies encontradas no Brasil (REIS *et al.*, 2016).

Apesar da grande diversidade da ictiofauna na região neotropical, os peixes estão constantemente submetidos às ações antrópicas, principalmente devido as modificações dos habitats, como a construção de hidrelétricas, desmatamento, poluição das águas decorrente da urbanização, indústria e da agricultura, desencadeando uma variedade de impactos na dinâmica reprodutiva de espécies migratórias e na cadeia alimentar de espécies não migratórias (ARANTES *et al.*, 2019; MONAGHAN *et al.*, 2020). Soma-se a esses fatores os impactos sobre a ictiofauna nativa causada pela sobrepesca e introdução de espécies exóticas. Tais atividades impactam diretamente as espécies de peixes nativas e a colocam sob estado de ameaça de extinção de várias espécies de peixes (AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2021; PELICICE *et al.*, 2017).

Diante desse cenário de ações antrópicas e subsequente ameaça de extinção, torna-se necessário e mesmo imperativo que sejam levantadas características biológicas básicas e que permitam o manejo adequado dos recursos pesqueiros, de modo a promover o desenvolvimento sustentável. Dentro deste contexto, o *Pseudopimelodus mangurus* (Valenciennes, 1835), conhecida popularmente como bagre sapo, é uma espécie da família Pseudopimelodidae, que se distribui na bacia do Prata, a qual inclui as bacias dos rios Uruguai, Paraná, Paraguai e seus afluentes (RESTREPO-GÓMEZ *et al.*, 2020), e que na atualidade, as informações nos ambientes naturais sobre esta espécie são escassas. Recentemente, alguns trabalhos sobre a biologia desta espécie foram reportados na literatura, incluindo a reprodução, desenvolvimento embrionário, larvicultura e alevinagem (ARASHIRO *et al.*, 2018,

2020; SHIGUEMOTO *et al.*, 2021), assim como isolamento e criopreservação de células tronco (PESSOA, 2023).

Em 2014, no Estado de São Paulo, o *P. mangurus* foi listada entre as espécies em perigo de extinção na classificação de vulnerável (VU) segundo Decreto Nº 60.133, DE 7 DE FEVEREIRO DE 2014 do estado de São Paulo, assim como no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada do Estado de São Paulo (ICMBio/ MMA, 2014). No entanto, nas avaliações feitas em 2018, esta espécie foi incluída na categoria pouco preocupante e atualmente não foi incluída na lista de espécies avaliadas no estado de São Paulo (ICMBio / MMA, 2018). Ainda não se tem dados claros acerca desta espécie, evidenciando assim que a longo prazo possa ter um impacto sobre a sua biodiversidade dentro dos sistemas aquáticos.

Por se tratar de uma espécie crítica (pelos deficientes dados), se torna necessário os estudos da sua biologia, bem como a criação de um banco genético *ex situ*, que garanta a manutenção da diversidade genética das populações. Uma das metodologias promissórias para o uso de material genético armazenado em criobancos é a produção de quimeras de linha germinativa por meio do transplante de células germinativas primordiais (PGCs), oriunda da sigla em inglês (*Primordial germ cells*). As PGCs são as primeiras linhagens de células germinativas, que participam da formação das gônadas por meio da migração ativa até a crista gonadal durante o desenvolvimento embrionário (BLASSER *et al.*, 2005; HYTTEL *et al.*, 2010). Nas gônadas, as PGCs são diferenciadas em espermatogônias e oogônias-tronco, via a diferenciação espermatogênica (masculina) e oogênica (feminina), respectivamente, juntamente com a ajuda das células somáticas (BLASER *et al.*, 2005; RIESCO *et al.*, 2012).

As PGCs podem ser usadas para a geração de quimeras germinativas, transplantando-as de um peixe para outro, como por exemplo, transplantar PGCs de uma espécie ameaçada, a um receptor estéril. Esse receptor passará a produzir gametas da espécie doadora, servindo, portanto, como uma ferramenta de reconstituição de espécies ameaçadas. Embora seja uma tecnologia promissora, é necessário o estabelecimento de etapas para geração da quimera germinativa, como a identificação e isolamento das PGCs do doador e preparação do receptor (esterilização) para transplante (ROBLES *et al.*, 2017). Essa estratégia pode ser promissora para a conservação e manutenção da diversidade genética das populações de *P. mangurus*.

A tecnologia do quimerismo germinativo utilizando PGCs isoladas como células doadoras, depende de metodologias apuradas para a identificação e isolamento de PGCs viáveis do doador, bem como para sua posterior caracterização e análise funcional de tais células no hospedeiro. Um dos procedimentos utilizados para a identificação de PGCs *in vivo* durante sua especificação e posterior migração, é a expressão de um gene repórter, como da proteína fluorescente verde (GFP), fusionada com a região 3'UTR de mRNA expressos especificamente em PGCs (SUN *et al.*, 2017). Esta região 3'UTR é uma região reguladora da tradução destes mRNA (siglas dadas pelo nome em inglês messenger Ribonucleic Acid) provenientes da herança materna, os quais são distribuídos em células específicas durante as primeiras clivagens do embrião e que darão origem as PGCs (ABRAMS; MULLINS, 2009; LUBZENS *et al.*, 2017).

A identificação *in vivo* de PGCs durante o desenvolvimento embrionário é feita mediante a microinjeção de mRNA sintético produzido a partir dos transcritos das regiões 3'UTR dos mRNAs específicos de PGCs, tais como *dazl* (LI *et al.*, 2016), *dnd1* (ZHU *et al.*, 2018), *nanos3* (XIAO *et al.*, 2019), *buc* e *ddx4* (SONG *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2020), pois a região 3'UTR de genes específicos de PGCs atuam na regulação da tradução do mRNA nas PGCs, e estas sequências são utilizadas para controlar a tradução de um gene repórter nas PGCs dos embriões, quando o mRNA sintético é microinjetado em zigotos, possibilitando a identificação das PGCs. Esta técnica de marcação de PGCs foi bem-sucedida em diferentes espécies de peixes, tais como carpa (KAWAKAMI *et al.*, 2011), esturjão (SAITO *et al.*, 2014a) e pikeperch (GÜRALP *et al.*, 2017), dentre outras, possibilitando a visualização das PGCs pela microscopia de fluorescência.

Na atualidade, a visualização das PGCs de uma espécie pode ser obtida utilizando regiões 3'UTR de mRNA de outras espécies, obtendo com sucesso a marcação das PGCs na maioria dos casos (COELHO *et al.*, 2019, 2021; SAITO *et al.*, 2006). Isso é possível devido a conservação das sequências destas regiões 3'UTR entre os organismos vivos, pois os genes podem ser bem conservados entre as espécies (XIAO *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2020) ao compartilhar um grau de similaridade no genoma nestes segmentos de DNA.

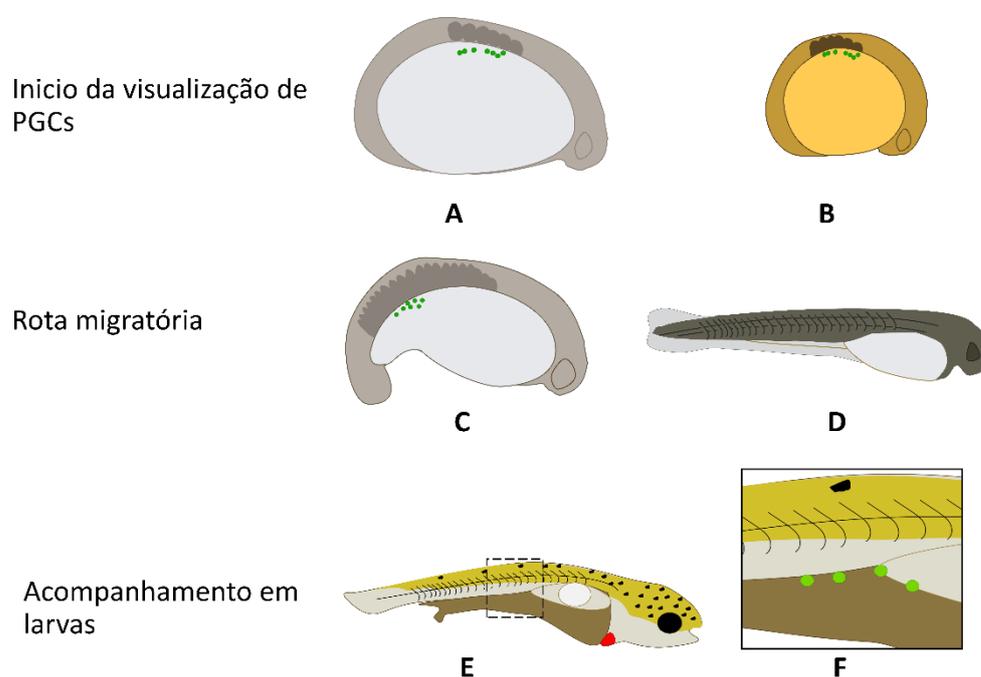
O início da visualização de PGCs varia de espécie para espécie (MERCER *et al.*, 2021) e do gene empregado para se sintetizar o mRNA, por exemplo, com o uso de *nos1* 3'UTR de peixe zebras, as PGCs foram observadas durante o estágio de

gástrula com 50% de epibolia em medaka e em peixe zebra (SAITO *et al.*, 2006), durante a fase de segmentação em espécies neotropicais como pacú (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*) (COELHO *et al.*, 2019, COELHO *et al.*, 2021). Por outra parte, *dnd1* 3' UTR permitiu a identificação das PGCs durante a segmentação em *Oryzias celebensis* (ZHU *et al.*, 2018) e *ddx4* 3'UTR durante a segmentação em bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) (GE *et al.*, 2020). Assim, as fases do desenvolvimento nas quais foram visualizadas as PGCs evidenciam as divergências entre as espécies nos processos de transcrição e ativação de genes e proteínas durante o desenvolvimento embrionário (MERCER *et al.*, 2021).

Assim, nas espécies neotropicais as rotas migratórias de PGCs foram determinadas pela microinjeção de mRNA sintetizado *in vitro*, contendo a região reguladora de tradução 3'UTR do *nanos1* de peixe zebra fusionada ao gene repórter *gfp* em *Astyanax altiparanae* (SILVA, 2016) e *Prochilodus lineatus* (COELHO *et al.*, 2019). Estes estudos servem de base para a compreensão de como as rotas migratórias de PGCs nas famílias destas espécies neotropicais devam ocorrer. A rota migratória de PGCs pode ser rastreada após o início da expressão de proteínas fluorescentes (presuntivamente PGCs) durante desenvolvimento embrionário (somitogênese), até a posterior migração ativa até a crista genital na fase de eclosão e nas larvas onde as PGCs fluorescentes são observadas (Figura 1), sendo uma base importante para determinação das rotas em outras espécies neotropicais, o que permite definir os padrões migratórios e de proliferação celular (ROBLES *et al.*, 2017). Além disso, as informações acerca do início de visualização e migração são indispensáveis para o isolamento, cultura e transplante das PGCs.

Apesar do uso da região 3'UTR de uma espécie ser capaz de ser utilizado na identificação de PGCs de outras espécies, foi verificado que em algumas espécies endêmicas da região neotropical, a região 3'UTR de uma espécie pode não ser funcional em outras, como no caso de *P. mangurus*, onde as PGCs não foram identificadas pela expressão de GFP utilizando a região 3'UTR do *nanos1* de peixe zebra (SHIGUEMOTO *et al.*, 2022). Os autores também não conseguiram identificar as PGCs de bagre sapo mesmo com mRNA sintetizado construído com a região 3'UTR de *buc* e *nanos3* de bagre sapo.

Figura 1- Rotas migratórias de PGCs *in vivo* nas principais espécies neotropicais usando o marcador *nos1* 3'UTR de peixe zebra

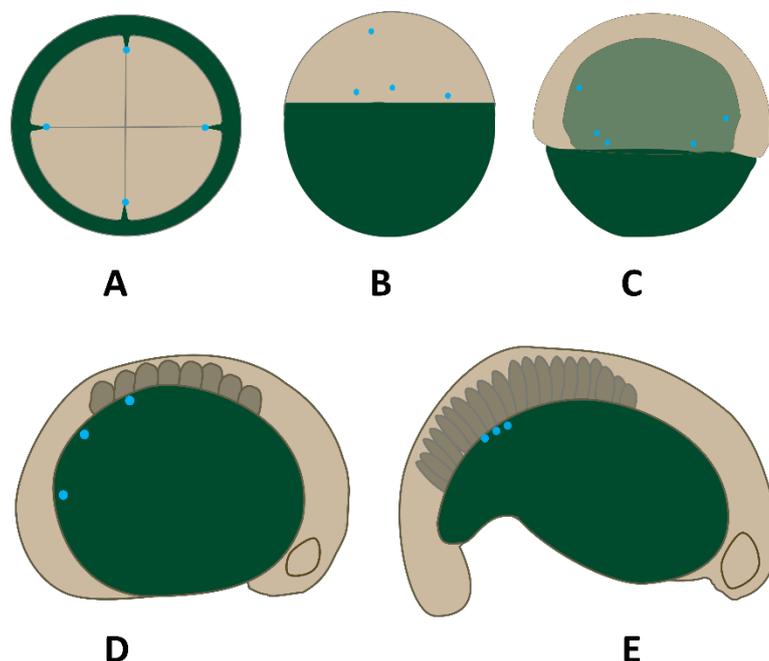


FONTE: ROSERO J.M., 2023

LEGENDA: **A-** Embrião *P. lineatus* em segmentação com 6 somitos, **B-** Embrião *A. altiparanae* em segmentação com 6 somitos, **C-** Embrião *P. lineatus* em segmentação com 20 somitos, **D-** Larva recém eclodida *P. lineatus*, **E-** Larva de *P. lineatus* 10 dpe, **F-** Area magnificada da quadricula em **E**. Os pontos verdes indicam as PGCs.

Ainda neste trabalho, através da técnica de WISH, utilizando sonda antisense do mRNA da região codificadora de *nanos3* de bagre sapo, foi obtido o padrão de distribuição dos transcritos de *nanos3* durante as clivagens iniciais e a identificação e migração das PGCs durante o desenvolvimento embrionário de *P. mangurus*. O esquema de distribuição dos mRNAs de *nanos3* nas etapas iniciais de clivagem e a migração de PGCs observado no desenvolvimento embrionário de bagre sapo, está ilustrado na Figura 2. Este trabalho foi utilizado como referência para a localização das PGCs *in vivo*, nos embriões microinjetados com mRNA sintético contendo a região 3'UTR de *ddx4* de bagre sapo.

Figura 2- Distribuição dos transcritos de *nanos3* durante a embriogênese de *Pseudopimelodus mangurus* usando a sonda antisense de RNA de *nanos3* de bagre sapo



FONTE: ROSERO J.M., 2023

LEGENDA: **A**-Clivagem com 4 células, **B**- blástula em domo, **C**- gástrula com 70% de epibolia, **D**- segmentação com 8 somitos, **E**- segmentação com 20 somitos. Os pontos azuis claros indicam os sinais de *nanos3*.

O bagre sapo é uma espécie com reprodução sazonal, sendo o principal período reprodutivo entre os meses de novembro e dezembro, faz com que as atividades que envolvam a reprodução desta espécie sejam limitadas a este período reprodutivo. Devido a esta limitação, torna-se necessário o uso de outras espécies que apresentem mais que uma reprodução durante o ano para o estabelecimento de procedimentos a serem utilizados no bagre sapo durante o período reprodutivo.

No presente trabalho busca-se a identificação *in vivo* das PGCs de *P. mangurus*, o qual requer a construção de um vetor de transcrição para a síntese de mRNA *in vitro*, contendo um gene repórter (GFP ou DsRed) fusionada a região 3'UTR de *ddx4* e *dnd1* de bagre sapo e a microinjeção em zigotos de duas espécies de Characiformes (*A. altiparanae* e *P. lineatus*), para avaliação da funcionalidade e conservação da região 3'UTR anterior ao uso no bagre sapo. Além disso, foi realizada a verificação da expressão dos genes *ddx4* e *dnd1* nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de *P. mangurus* para a validação do uso das regiões 3'UTR desses genes para marcação de PGCs. Também foi avaliada a especificidade da expressão em diferentes tecidos de adultos.

Considerando que as rotas de migração podem variar entre as espécies, as informações obtidas usando diferentes marcadores específicos de PGCs também podem ser indispensáveis para o acompanhamento de PGCs transplantadas no quimerismo da linhagem germinativa. A partir dessas informações, objetiva-se consolidar criobancos de germoplasma de bagre sapo, que futuramente podem ser utilizados para a propagação mediada, usando o transplante das PGCs em receptores híbridos estéreis, contribuindo com a manutenção e diversidade populacional desta espécie, além de utilizar os mRNAs sintéticos gerados para a marcação de PGCs de outras espécies.

## 2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESE

As regiões 3'UTR de *dnd1* e *ddx4* de bagre sapo fusionadas como a região codificadora de uma proteína fluorescente podem regular *in vivo* a tradução do gene repórter, como ocorre para os mRNAs de *ddx4* e *dnd1* em PGCs de bagre sapo durante o desenvolvimento embrionário, sendo efetivas para a marcação de PGCs.

### 2.2 OBJETIVO GERAL

Rastrear a rota migratória das células germinativas primordiais *in vivo* durante o desenvolvimento embrionário do bagre sapo (*Pseudopimelodus mangurus*), utilizando as regiões 3'UTR reguladoras da tradução dos mRNAs específicos destas células (*dnd1* e *ddx4*).

### 2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desenhar mRNA sintético utilizando os genes repórteres GFP e DsRed fusionados às regiões 3'UTR dos transcritos de mRNA de *ddx4* e *dnd1* de *P. mangurus*.
- Avaliar a expressão relativa dos genes *dnd1* e *ddx4* de *P. mangurus* ao longo do desenvolvimento e em tecidos de adultos, para validação do uso das regiões 3'UTR destes genes específicos de PGCs na marcação destas células.
- Identificar PGCs de bagre sapo através da microinjeção do mRNA sintético em zigotos de *P. mangurus*.
- Avaliar a funcionalidade e eficiência de marcação de PGCs de *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus* utilizando mRNA sintético contendo as regiões 3'UTR provenientes de bagre sapo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Pseudopimelodus mangurus*

A ordem Siluriformes dos teleósteos constitui um dos maiores grupos de peixes contendo 3975 espécies descritas no mundo (RESTREPO-GÓMEZ *et al.*, 2020), sendo 54 espécies pertencentes a família da Pseudopimelodidae (FRICKE, ESCHMEYER & FONG., 2022). Esta família é considerada a menos conhecida entre os bagres neotropicais que se distribuem exclusivamente em água doce na América do Sul e Panamá.

O gênero *Pseudopimelodus* inclui seis espécies (*P. atricaudus*, *P. bufonius*, *P. charus*, *P. magnus*, *P. mangurus* e *P. schultzi*), embora a diversidade genética dos peixes da família Pseudopimelodidae, como do gênero *Pseudopimelodus*, ainda não é documentada em sua totalidade, devido à alta divergência genética observada entre os espécimes dos rios (RESTREPO-GÓMEZ *et al.*, 2020). Dentro deste gênero, se encontra o bagre sapo (*Pseudopimelodus mangurus*) que é com a distribuição restrita às Bacias Paraguai, Paraná e Uruguai (FERRARIS, 2007; VERA-ALCARAZ; RIOS; EMHART VULETICH, 2017).

Esta espécie apresenta características morfológicas que a destacam, sendo de tamanho robusto, alcançando até 70 cm de comprimento e 10 kg peso, com uma coloração parda-amarelada com manchas escuras e olhos pequenos cobertos por pele (SHIBATTA *et al.*, 2021; VERA-ALCARAZ; RIOS; EMHART VULETICH, 2017). Os detalhes reprodutivos, alimentares e comportamentais seguem o padrão de outras espécies carnívoras do gênero *Pseudopimelodus*, pois habitam fundo de rios e córregos, e se alimentam de peixes que ficam entre as raízes e rochas, considerando-se como peixes oportunistas (SHIBATTA *et al.*, 2021; SHIGUEMOTO, 2020).

Embora, as informações de alimentação, manejo e reprodução do bagre sapo em cativeiro foram recentemente reportadas (ARASHIRO *et al.*, 2020; SHIGUEMOTO, 2020), os detalhes acerca da população (reprodução, idade de maturação gonadal, diversidade genética) atual de *P. mangurus* dentro do habitat natural são escassos. No estado de São Paulo, nos estudos recentes de identificação da ictiofauna no afluente da bacia Paraná (rio Mogi Guaçu) não foram evidenciadas amostras de ovos ou larvas de *P. mangurus* nas coletas realizadas durante o período reprodutivo, de novembro a dezembro de 2017 e 2019 (OMURA; COSTA, 2021). Considerando que

ao ser uma espécie com distribuição em áreas geográficas pequenas, o pouco conhecimento acerca desta espécie dificulta as estratégias de conservação *in situ* e *ex-situ*.

A principal forma para manutenção da diversidade genética por meio de bancos genéticos é utilizar as PGCs, que são células altamente especializadas e precursoras de gametas que envolvem oócitos e espermatozoides como material de preservação e reconstituição por meio do transplante de PGCs entre embriões, contribuindo com a propagação do material genético nas seguintes gerações, sendo uma técnica promissora para a propagação de espécies ameaçadas (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2018).

### 3.2 CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS

As células germinativas primordiais ou primordial germ cells (PGCs pela sigla em inglês) são células embrionárias responsáveis pela formação da linhagem germinativa (espermatogônia e oogônias-tronco) que darão origem aos oócitos nos ovários ou espermatozoides nos testículos (HYTTEL *et al.*, 2010), sendo fundamentais para dar continuidade à propagação de uma espécie.

Nos teleósteos, durante a oogênese, os mRNAs e proteínas maternas são sintetizados e acumulados no ovo e cuja função será indispensável durante a embriogênese inicial até a ativação do genoma do zigoto (ABRAMS; MULLINS, 2009; LUBZENS *et al.*, 2017). Estes componentes maternos, são utilizados nos processos biossintéticos básicos para sobrevivência do embrião determinado o destino e o padrão celular inicial (OMURA; LOTT, 2020; TADROS; LIPSHITZ, 2009). Entre os componentes do germoplasma estão os RNAs codificantes e não codificantes, proteínas, ribossomos e mitocôndrias que formam partículas eletrodensas chamadas grânulos germinativos também conhecido como Ribonucleoproteínas (RNPs) (HANSEN; PELEGRI, 2021; PORRAS-GÓMEZ; VILLAGRÁN-SANTACRUZ; MORENO-MENDOZA, 2021).

### 3.2.1 Especificação de PGCs

A herança materna indispensável para a especificação das PGCs é encontrada nos componentes do germoplasma, pois após a maturação do ovócito e subsequente ativação do ovo e fertilização, a maioria dos RNPs do germoplasma que se localizam ao longo do blastodisco (pólo animal) e se deslocam nos sulcos de clivagem, conforme ao avanço das divisões até o estágio de doma onde os agregados de germoplasma (RNPs e RNAs) preenchem o citoplasma da célula predestinada como a PGC (D'ORAZIO *et al.*, 2021; HANSEN; PELEGRI, 2021). Tem sido relatado que a quantidade do germoplasma depositado nos ovos durante a maturação dos oócitos é o fator limitante que determina o número de PGCs, assim quanto maior a quantidade de germoplasma no oócito, maior será o número de PGCs no embrião (HANSEN; PELEGRI, 2021; HERPIN *et al.*, 2007).

Existem transcritos que são traduzidos e mantidos nas PGCs, durante a especificação e posterior migração, em quanto outros transcritos de origem materno são degradados (BLASER *et al.*, 2005; D'ORAZIO *et al.*, 2021; TADROS; LIPSHITZ, 2009). Um dos principais transcritos de origem materna, envolvido na especificação, é *buc* que codifica a proteína bucky ball. Este gene é bem conservado entre as espécies e está relacionado com a orientação na distribuição do germoplasma, determinando assim o número de PGCs em peixe zebra e medaka (ROBLES *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2021).

Outro importante mRNA é o *nanos*, o qual se expressa no início do desenvolvimento da linhagem germinativa e está envolvido na sobrevivência das PGCs (ABRAMS; MULLINS, 2009). Nanos, atua durante a especificação se ligando aos RNAs maternos necessários para a proliferação e autorrenovação das células germinativas (LUBZENS *et al.*, 2017). Vasa (Ddx4) tem atividade de helicase dependente de RNA é crítico para ativação e tradução de mRNAs, incluindo o *nanos* em *Drosophila*, contribuindo assim com a especificação das PGCs e ativação das proteínas necessárias para o desenvolvimento contínuo de células germinativas (LUBZENS *et al.*, 2017).

No entanto a localização dos RNAs de origem materno, como os mecanismos utilizados para a determinação das PGC durante o desenvolvimento embrionário em peixes podem ser dependentes da espécie (NARAINÉ *et al.*, 2022).

### 3.2.2 Migração de PGCs

Os mecanismos de migração são acionados desde que as PGCs são especificadas até atingirem a região da crista gonadal, onde a gônada será constituída (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; SAITO *et al.*, 2006). Sabe-se que os padrões de migração estão ligados em cada espécie pelo tamanho espacial (ou tamanho do oocito) e pelas mudanças temporais nos domínios quimioatraentes (GOTO; SAITO, 2019; GÜRALP *et al.*, 2017). Os dados obtidos em espécies como o peixe zebra ou medaka só podem ser tomados como referência para a caracterização de migração em outras espécies de teleósteos de água doce.

A migração é obtida a partir do conjunto de fatores celulares e de sinalização que conduzem as PGCs até a crista gonadal, e que na maioria dos peixes inicia-se durante a somitogênese (GOTO; SAITO, 2019). Em quanto as sinalizações externas, no peixe zebra a quimiocina conhecida como fator de crescimento derivado do estroma (SDF-1) é considerado o principal sinalizador que direciona os movimentos das PGCs até a crista genital, graças ao receptor específico CXCR4 localizado nas PGCs (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; WONG; ZOHAR, 2015). Desta forma as PGCs seguem os altos níveis de expressão de *sdf-1* mRNA nas células somáticas (ROBLES *et al.*, 2017). Por outra parte, os fatores celulares estão ligados às funções das proteínas traduzidas a partir dos transcritos de mRNA localizados no citoplasma das PGCs que influenciam os processos de diferenciação, migração, manutenção e supervivência de PGCs, bem como na colonização na crista genital e formação de gametas em peixes, sendo bem definidos os mRNAs dos genes *ddx4*, *dazl*, *dnd1*, *nanos3* (*nos3*) (DUANGKAEW *et al.*, 2019; RIVERS; DALY; UMA, 2020)

Em relação ao padrão de migração, em termos gerais as PGCs se deslocam pela parte ventral da endoderme e, via mesentério, se distribuem dorsalmente ao intestino primitivo em direção à crista genital inicial (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; NAGASAWA *et al.*, 2013; SAITO *et al.*, 2014; YAMAHA *et al.*, 2010). O modelo de deslocamento de PGCs foi observado em espécies de teleósteos como medaka (ZHU *et al.*, 2018), peixe zebra (SAITO *et al.*, 2006; YAMAHA *et al.*, 2010) e truta (KNAUT *et al.*, 2002). Em espécies neotropicais (curimba e pacu) as PGCs se encontraram em ambos lados do eixo dorsal e migraram dorsolateral a extensão do vitelo até o primórdio gonadal (COELHO *et al.*, 2019, 2021).

### 3.2.3 Colonização

A crista genital inicial ou tecido gonadal inicial é constituído por populações celulares do mesênquima e células derivadas do epitélio celômico (HYTTEL *et al.*, 2010), sendo o alvo da chegada das PGCs. O número inicial de PGCs que se proliferaram na crista gonadal já foi relacionado com a determinação sexual do indivíduo adulto, assim no peixe zebra, foi verificado que um elevado número de PGCs promove o desenvolvimento de gônada feminina (GE *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2021; YE *et al.*, 2019), enquanto o número reduzido ou mesmo a ausência de PGCs, ocorre a formação de testículos (HERPIN *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2017). No entanto, fatores externos como temperatura, densidade populacional, pH, entre outros, também vão influenciar na diferenciação sexual durante o crescimento do indivíduo (RAJENDIRAN *et al.*, 2021), porém as PGCs não são as únicas células responsáveis pela determinação sexual em peixes.

O entendimento dos mecanismos de migração começando da posição em que as PGCs são especificadas até a região onde a gônada vai ser formada devem ser claros ao produzir quimeras da linha germinativa de uma espécie. Por isso a identificação das PGC e sua via migratória durante a embriogênese são investigadas usando genes próprios das células germinativas primordiais.

### 3.3 MARCADORES CELULARES

Durante a fase de blástula, começa a regulação seletiva de mRNAs maternos bem como a ativação da transcrição do genoma do embrião (CIRUNA *et al.*, 2002; MISHIMA *et al.*, 2006), pois a maioria dos mRNAs provenientes da herança materna, começam a ser degradados por RNase em ação coordenada por microRNAs (OSMAN; PEK, 2021; TADROS; LIPSHITZ, 2009). Um dos principais microRNAs envolvidos na degradação do mRNAs de origem materna é o microRNA-430 (miR-430), que é expresso no início da transcrição zigótica e que no peixe zebra não faz parte dos RNA de origem materna (LUBZENS *et al.*, 2017).

No entanto, alguns dos mRNAs maternos que desempenham funções essenciais para as PGCs são mantidos nestas células durante o toda a embriogênese e podem ser utilizados como marcadores dessas células. Entre os transcritos mais

importantes de PGCs estão os dos genes *ddx4*, *dazl*, *dnd1*, *nanos3* (*nos3*), *buc*, *tdrd7* que são expressos durante o desenvolvimento embrionário, e estão associados à formação, migração, sobrevivência de PGCs, colonização na crista genital e formação de gametas em peixes, sendo observado níveis variáveis de expressão de genes entre as espécies, durante a embriogênese (D'ORAZIO *et al.*, 2021; DUANGKAEW *et al.*, 2019; RIVERS; DALY; UMA, 2020).

Assim, durante a especificação, migração e colonização os genes com funções vitais para as PGCs são utilizados para identificação e rastreabilidade de PGCs, por exemplo o *dazl* ao antagonizar o miR-430 promove a correta especificação da linha germinativa no peixe zebra (TAKEDA *et al.*, 2009), em quanto em medaka a expressão de *dazl* afeta o número das PGCs durante a especificação (LI *et al.*, 2016)

O *ddx4*, também conhecido como *vasa*, tem sido utilizado nos estudos de PGCs. Este gene pertencente à família DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp), codifica uma RNA helicase dependente de ATP, sendo identificado pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* como determinante materno na formação das células germinativas (DUANGKAEW *et al.*, 2019; RAZ, 2000; YÖN; AKBULUT, 2015). O *ddx4* é essencial na estabilização dos mRNAs presentes nas PGCs, desempenhando ações na regulação, diferenciação e migração de PGCs durante o desenvolvimento embrionário e durante a gametogênese nos adultos de peixe zebra (WU *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2020).

Outro gene bastante estudado em PGCs é o *dnd1*, cujas funções estão relacionadas com a proteção de mRNAs nas PGCs durante a embriogênese inicial, se ligando às regiões ricas em uracila da região 3'UTR de *nanos3*, *nanos1* e *tdrd7*(KEDDE *et al.*, 2007). Dnd1 liga-se a um motivo trinucleotídico UU(A/U) predominantemente nas regiões 3'UTR dos mRNAs e neutraliza a função de vários microRNAs (miRNAs), impedindo que se liguem aos mRNAs alvo e, portanto, prevenindo a degradação e decaimentos desses mRNAs nas PGCs (ABRAMS; MULLINS, 2009; WONG; ZOHAR, 2015; YE *et al.*, 2019). Graças a essa repressão mediada por Dnd1, especificamente na linhagem germinativa, e não em células somáticas, Dnd1 promove a expressão específica de genes nas PGCs.

Em ratos, durante o desenvolvimento embrionário a perda da expressão do *dnd1* pode levar à formação de tumores testiculares pela deficiência de células germinativas primordiais o que provoca a esterilidade nos adultos (BHATTACHARYA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2018; NORTHROP *et al.*, 2011) evidenciando a importante função

de *Dnd1* por meio da regulação translacional de genes do ciclo celular, desencadeando a parada da mitose em células germinativas masculinas (COOK *et al.*, 2011; YOUNGREN *et al.*, 2005) considerado se um fator crítico para o desenvolvimento da linha germinativa de peixes e mamíferos (BALOCH *et al.*, 2019; RIVERS; DALY; UMA, 2020).

No entanto, existem algumas diferenças nas funções destes genes, próprias de cada espécie, que influenciam nos tempos de especificação, migração e estabelecimento das rotas migratórias das PGCs (LUBZENS *et al.*, 2017; RESTREPO-GÓMEZ *et al.*, 2020). Por exemplo, *ddx4* não está associado à proliferação e sobrevivência de PGC em medaka, mas ainda é necessário para a migração destas células (NAGASAWA *et al.*, 2013). Em fêmeas de peixe zebra, *dnd1* parece ser necessário para o desenvolvimento do ovário, mas não é necessário para a determinação do testículo (NOBLE, *et al.*, 2019) e considerando que a migração direcionada de PGC requer *dnd1* funcional, este gene pode ser utilizado para identificar PGC (JIN *et al.*, 2018).

Graças aos recentes desenvolvimentos técnicos de manipulação de embriões, é possível identificar as PGCs e rastreá-las durante sua migração ao local de desenvolvimento nas gônadas e diferenciá-las de outras células somáticas, mediante uso das regiões reguladoras de tradução (5'UTR e 3'UTR) presentes nos transcritos de mRNA desses genes específicos (LINHARTOVA; SAITO; PSENICKA, 2014; NAGASAWA *et al.*, 2013)

As regiões 3'UTR dos transcritos de mRNA são importantes para a proteção de degradação dos mRNA, regulação da tradução incluindo a modulação do transporte, eficiência da tradução e localização celular do produto gênico (MIGNONE *et al.*, 2002), proporcionando a estabilidade do mRNA com a posterior expressão do gene nas PGCs (SUN *et al.*, 2017; YE *et al.*, 2019). Desta forma, as regiões 3'UTR dos mRNAs específicos de PGC tais como *dnd1* e *ddx4* podem ser utilizadas para a detecção da tradução destes mRNAs em PGCs durante o desenvolvimento embrionário, utilizando a região codificadora de um gene repórter (proteína fluorescente), fusionado com a região 3'UTR dos genes acima mencionados nas células alvo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

As matrizes e reprodutores de bagre-sapo (*Pseudopimelodus mangurus*) foram capturados, com licença de coleta SISBIO - 31836-10, no rio Mogi Guaçu, na cidade de Pirassununga durante o período reprodutivo de novembro a dezembro (2021-2022). As reproduções foram induzidas hormonalmente nas dependências do Laboratório de Biotecnologia de Peixes, do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), em Pirassununga (SP). O manejo dos reprodutores foi feito de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais do CEPTA-ICMBio (CEUA 02031.000114/2022-31) e da USP (CEUAX N 3595161122)

### 4.1 INDUÇÃO HORMONAL, COLETA DE GAMETAS E FERTILIZAÇÃO

#### 4.1.1 Bagre sapo

As reproduções foram feitas seguindo os protocolos estabelecidos por ARASHIRO et al., (2018) e SHIGUEMOTO et al., (2020). Adultos de *P. mangurus* foram selecionados pelas características externas relacionadas com a aptidão para a reprodução induzida como coloração avermelhada na área da papila urogenital e aumento de volume na região abdominal.

Assim, 4 casais capturados foram mantidos em caixas circulares de 2000 L com fluxo constante de água numa temperatura de 26°C. A indução hormonal foi feita usando hipófise desidratada de carpa comum (CCPE, Hoepers Produtos Agropecuários, Rio do Sul, Brazil) diluído em soro fisiológico 0,9%. Nas fêmeas foram aplicadas duas doses de CCPE, a primeira de 0,6 mg/kg e a segunda de 6 mg/kg, com intervalo de 6 h (168 horas grau) entre as aplicações. Os machos receberam uma única dose de CCPE, na concentração de 6 mg/kg, sendo a administração realizada no mesmo momento da segunda dose nas fêmeas. A solução de CCPE foi injetada na base da nadadeira pélvica dos animais.

Para a coleta do sêmen, os machos (1 por cada fêmea induzida) foram eutanasiados com uma overdose de solução anestésica de eugenol (500 mg/L) (Biodinâmica®, Ibiporã-PR, Brazil), e as gônadas foram excisadas longitudinalmente

na região ventral e trituradas em uma solução imobilizadora de espermatozoides MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma # M0268, St. Louis, USA). Seis horas após a segunda dose, as fêmeas foram anestesiadas em 100 mg/L de eugenol e os oócitos foram extrusados manualmente por massagem abdominal em recipientes secos. A inseminação foi realizada adicionando-se o sêmen diluído sobre a massa de oócitos e a ativação dos gametas foi realizada pela adição de água. Para otimizar a fertilização, foram realizados movimentos circulares por 90 segundos para assegurar o acesso dos espermatozoides aos oócitos. Após cerca de 2 minutos, tempo aproximado de motilidade espermática as alíquotas de ovos foram utilizadas para a microinjeção de mRNA.

#### 4.1.2 Espécies controle para avaliação de mRNA sintético

As reproduções foram feitas seguindo as indicações para lambari (YASUI *et al.*, 2015) e para curimba (COELHO *et al.*, 2019).

Assim 3 casais de *P. lineatus* e *A. altiparanae* foram selecionados pelas características externas relacionadas com a aptidão para a indução hormonal. As fêmeas de lambari e curimba apresentaram coloração avermelhada na área da papila urogenital e aumento de volume na região abdominal. Os machos de curimba apresentaram o som característico e a liberação de sêmen após a massagem na região abdominal. Os machos de lambari foram selecionados pelo dimorfismo sexual, pela presença de espículas na nadadeira anal.

Os reprodutores selecionados de *A. altiparanae* foram distribuídos em aquários de 100 L e mantidos em temperatura controlada de 26°C, enquanto que os de *P. lineatus*, foram mantidos em caixas circulares de 2000 L com fluxo constante de água, na temperatura de 26°C. A indução hormonal foi feita usando CCPE, diluído em soro fisiológico a 0,9%, sendo injetado na base da nadadeira pélvica, com duas administrações para fêmeas (curimba e lambari), nas dosagens de 0,5 mg/kg e 5 mg/kg, com o intervalo de 6 horas para lambari e 8 horas para curimba. Os machos receberam uma única aplicação, na dosagem de 5 mg/kg, administrado junto com a segunda aplicação nas fêmeas. Nas seguintes 6 horas em lambari e 8 horas em curimba, após a segunda aplicação, os gametas foram coletados e realizada a fertilização pelo método seco.

Para a coleta de gametas, os animais foram anestesiados em solução de eugenol (Biodinam®, Ibiporã-PR, Brasil). Os ovos obtidos pela extrusão de lambaris foram dispostos em placas de Petri (100 x 20 mm) coberta com filme plástico, formando uma superfície côncava. O sêmen foi coletado utilizando uma micropipeta de 200 µl (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e imediatamente transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 400 µl de solução de Ringer modificada (128,3 mM de NaCl, 23,6 mM de KCl, 3,6 mM de CaCl<sub>2</sub> e 2,1 mM de MgCl<sub>2</sub>) e mantido a 25°C. Para a fertilização, o sêmen diluído em Ringer foi adicionado à massa de oócitos, seguido pela ativação dos gametas pela adição de água, bem como a hidratação dos ovos, mantendo a placa em movimentos circulares durante 2 minutos.

Os oócitos de curimba foram obtidos pela extrusão em recipientes plásticos secos, seguido pela adição de sêmen, e posterior adição de água. Os ovos foram mantidos durante dois minutos com movimentos circulares constantes. Após fertilização as alíquotas de ovos de curimba e lambari foram utilizadas para a microinjeção de mRNA.

#### 4.2 COLETA DE AMOSTRAS E TECIDOS PARA AVALIAÇÕES MOLECULARES

A partir da desova e fertilização do bagre sapo, amostras de diferentes fases embrionárias foram coletadas, incluindo os estágios de desenvolvimento (ovos não fecundados, embrião com duas células, embrião com oito células, blástula, gástrula com 50% de epibolia, segmentação com 10 somitos e eclosão). As larvas foram coletadas durante sete dias após a eclosão, sendo o número de larvas coletadas variável de acordo com a fase. No primeiro dia, iniciou se com 14 larvas e terminou com quatro larvas no sétimo dia após a eclosão. Para a obtenção dos tecidos, 1 macho e 1 fêmea adultos foram sacrificados com uma overdose de solução anestésica de eugenol (500 mg/L) e as gônadas, cérebro, fígado, rim e músculo foram coletados para a posteriores análises moleculares.

### 4.3 EXTRAÇÃO DE mRNA DAS AMOSTRAS COLETADAS

A extração do RNA total das amostras coletadas de *P. mangurus* foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Ambion #15596026, Carlsbad, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado e a pureza avaliada pela relação das absorbâncias A260/A280 utilizando o espectrofotômetro microfluídico UV-visível QIAxpert (QIAGEN, Hilden, Alemanha). As amostras de RNA extraídas foram armazenadas a -80°C até seu uso. Antes da síntese da primeira fita de cDNA, 1 µg de RNA total foi tratado com DNase 1 (Sigma AMPD1-1KT, St Louis, USA) para degradação de qualquer contaminante de DNA genômico.

### 4.4 DESENHO DE PRIMERS

As sequências das regiões codificadora e 3'UTR do mRNA de *ddx4* e *dnd1* de *P. mangurus* foram obtidas a partir do transcriptoma de ovo (depositado no NCBI: BioProject ID: PRJNA819998). As sequências codificadoras dos mRNAs de *ddx4* e *dnd1* foram obtidas com o uso do programa *Open Reading Frame Finder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), bem como a determinação do início da região 3'UTR de cada mRNA. Os primers específicos *forward* (GSP) das regiões 3'UTR de *ddx4* e *dnd1* foram desenhados a partir do início da sequência dessas regiões (Tabela 1). Para as sequências codificadoras de *ddx4* e *dnd1*, os primers *forward* e *reverse* foram desenhados com a ajuda do programa *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), visando o desenho de primers específicos para estes genes, utilizando como referência as sequências do *Pangasianodon hypophthalmus*, uma vez que as sequências do bagre sapo ainda não estavam disponíveis no NCBI. Os primers desenhados para a detecção da expressão destes genes durante o desenvolvimento embrionário, larval e em tecidos de adultos, também se encontram na Tabela 1.

Tabela 1- Sequências dos primers desenhados para amplificação das regiões codificantes e 3'UTR de *dnd1* e *ddx4*, e para a construção dos vetores de transcrição.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Uso</b>	<b>Tamanho (pb)</b>
<i>dnd1</i> 3'UTR-F	GCTTTGACCATCATGTGTTTTG	RACE	560
<i>ddx4</i> 3'UTR-F	ATACTAGGAGTTACTTTTTATG	RACE	511
AUAP-R	CGGCCACGCGTCTGACTAGTAC	RACE	-
<i>ddx4</i> 3'UTR <i>Xba</i> I-F	<b>TCTAGA</b> AATACTAGGAGTTACTTTTTATG	Construção vetor	516
AUAP- <i>Eco</i> RI- R	<b>GAATTC</b> GGCCACGCGTCTGACTAGTAC	Construção vetor	720
<i>EmGFP</i> -F	<b>AAGCTT</b> ATG GTGAGCAAG GGC GAG	Construção vetor	674
<i>EmGFP</i> -R	<b>TCTAG</b> ATTACTTGTACAG CTC GTC	Construção vetor	86
<i>Dsred-express</i> -F	<b>AAGCTT</b> ATGGCCTCCTCCGAGGAC	Construção vetor	150
<i>Dsred-express</i> -R	<b>TCTAG</b> ACTACAGGAACAGGTGGTG	Construção vetor	114
<i>Actb</i> -Fw	CGTGCTGTCTTCCCATCCA	PCR	
<i>Actb</i> -Rv	TCACCAACATAGCTGTCCCTTCTG	PCR	
<i>Ddx4</i> -Fw	ATCAGAGCCCAGTTGTGTTTT	PCR	
<i>Ddx4</i> -Rv	TCCCAAACTACCGCTACTG	PCR	
<i>Dnd1</i> -Fw	AAGAAGATGTACGGCGTGTC	PCR	
<i>Dnd1</i> -Rv	CATGGATTTTCAGACCGGGAG	PCR	

#### 4.5 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES NÃO TRADUZIDAS (3'UTR) DE *ddx4* E *dnd1*

O RNA total proveniente de ovo não fertilizado e gônada de fêmea foi utilizado na síntese de cDNA utilizando o kit 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen #18373-027, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o primer adaptador (AP) contendo o oligo (dT) proveniente do kit, visando à amplificação completa da sequência 3'UTR do *ddx4* e *dnd1*. As regiões 3'UTR foram amplificadas utilizando o cDNA gerado e os primer GSP *forward* (*dnd1* 3'UTR-F e *ddx4* 3'UTR-F) desenhados (Tabela 1) de cada gene e o primer AUAP (*reverse*) do kit 3' RACE.

As reações de amplificações das regiões 3'UTR de *dnd1* e *ddx4* foram realizadas utilizando o termociclador MultiGene (Multigene OptiMax Thermal Cycler TC9610, Labnet, Foster city, USA) em um volume final de 50 µl. A informação detalhada da PCR se mostra no apêndice A.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando TBE 0,5X (Tris, ácido bórico e EDTA) e 3,5 µL do corante SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™ #S33102) para cada 70 mL de gel. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram verificados pela comparação com o DNA referencial

de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen #10787018, Carisban, EUA). As bandas nos tamanhos esperados foram recuperadas do gel agarose a 1%, seguindo o protocolo do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega #A9281, Madison, USA). O DNA recuperado foi diluído em 30 µl de água DEPC e armazenado a -20°C.

Para a clonagem dos DNA recuperados correspondentes às regiões 3'UTR foi utilizado o vetor pGEM-T easy (pGEM-T System I, Promega #A3600, Madison, USA). As reações de ligação foram realizadas em um volume final de 15 µL, usando a enzima T4 DNA ligase, seguindo o protocolo do vetor de clonagem pGEM-T easy da Promega. A incubação foi feita a temperatura ambiente durante 5 horas

Os produtos das ligações foram utilizados para a transformação de bactérias DH-5α competentes por CaCl<sub>2</sub>. A transformação foi realizada por choque térmico a 42°C durante 90 segundos e 2 minutos no gelo. A incubação das bactérias transformadas foi feita durante 1 hora a 37°C com a adição de 800 µL de meio de propagação L.B. (L.B Broth, sigma #L3022-250G, Saint Louis, USA). As bactérias foram centrifugadas a 13.000 x g durante 1 minuto, o pellet de bactérias suspenso em 100 µL de meio LB e inoculadas em 20 mL de meio LB sólido, contendo 1% de ágar, 50 µg/mL de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 125 µg/mL do substrato cromogênico X-gal. As placas foram incubadas a 37°C durante uma noite. As colônias brancas foram selecionadas e cultivadas em meio de propagação LB contendo 50 µg/mL de ampicilina e mantidos sob agitação de 250 rpm a 37°C, durante uma noite.

Os vetores foram recuperados e purificados por minipreparação utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega #A1223, Madison, USA). Após a recuperação dos plasmídeos, foram avaliadas a concentração e qualidade do DNA no espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os vetores foram armazenados em microtubos (eppendorf, Alemanha) de 1,5 mL a -80°C. Posteriormente, foi verificada a clonagem das regiões 3'UTR por PCR. Para isso, foram utilizados os primers GSP *forward* (*ddx4* e *dnd1*) e o primer AUAP (*reverse*), bem como os primers T7 e SP6 do vetor de clonagem. A reação de PCR foi realizada nas mesmas condições da amplificação das regiões 3'UTR descritas no apêndice A, com o uso de 1 µL dos vetores recuperados. Aos produtos de amplificações foram visualizados em gel de agarose a 1% e os plasmídeos pGEM-T-*ddx4* 3'UTR e pGEM-T-*dnd1* 3'UTR foram enviadas para o sequenciamento para confirmação das sequências.

#### 4.6 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES 3'UTR CLONADAS

As sequências obtidas a partir da clonagem nos plasmídeos foram alinhadas com as sequências das regiões 3'UTR de *ddx4* e *dnd1* obtidas no transcrito do ovo de *P. mangurus* utilizando o programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Após a confirmação, as sequências alinhadas foram analisadas utilizando o programa BLAST Nucleotides (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para verificação de identidade destas regiões com outras espécies de siluriformes, como o *Pangasianodon hypophthalmus* e *Tachysurus fulvidraco*.

#### 4.7 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE TRANSCRIÇÃO

Através do sequenciamento, foi verificado que a região 3'UTR de *dnd1* não apresentava identidade com a sequência obtida no transcrito de oócito de *P. mangurus*. Várias tentativas de clonagem incluindo o desenho de novos primers para diferentes regiões, bem como o sequenciamento, foram realizadas. No entanto, não foi obtida a clonagem da região 3'UTR de *dnd1*. A partir destes dados, a construção do vetor de transcrição prosseguiu utilizando apenas a região 3'UTR de *ddx4* que era idêntica àquela vinda do transcrito. Após a confirmação da sequência da região 3'UTR de *ddx4* pelo sequenciamento, novos primers foram desenhados (*ddx4* 3'UTR XbaI-F e AUAP- EcoRI- R), incluindo os sítios de restrição (Tabela 1). Os primers foram utilizados para amplificar a região 3'UTR de *ddx4*, utilizando como molde o vetor pGEM-T-*ddx4* 3'UTR, previamente construído. A amplificação foi realizada utilizando as mesmas condições descritas para a amplificação da região 3'UTR de *ddx4* e *dnd1*. O produto da amplificação foi recuperado em gel de agarose a 1%, clonado no vetor pGEM-T easy, propagado em bactérias e recuperado por minipreparação, como descrito no subtítulo 4.5.

A região 3'UTR de *ddx4* incluindo os sítios de restrições clonada no pGEM-T easy foi utilizada para a construção dos vetores de transcrição, a serem usados na síntese de RNA *in vitro*. Os vetores pSP64-*gfp* e pSP64-*DsRed*, os quais contêm os genes repórteres para as proteínas fluorescente verde e fluorescente vermelha, já haviam sido previamente construídos no laboratório, utilizando o vetor de transcrição

pSP64 (Promega, Madison, USA). Os genes repórteres GFP e DsRed foram inseridos no vetor pSP64 utilizando as enzimas de restrição HindIII (IVGN0166, Anza™, Invitrogen™) e XbaI (IVGN0126, Anza™, Invitrogen™).

Os vetores pGEM-T-*ddx4* 3'UTR contendo os sítios de restrição, pSP64-*gfp* e pSP64-*DsRed* foram clivados com as enzimas de restrição XbaI e EcoRI (IVGN0014, Anza™, Invitrogen™), em reações separadas, em um volume final de 30 µL, contendo 3 µg de vetor e 3 µL de cada enzima. As reações foram incubadas a 37°C durante 15 minutos e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%. As bandas correspondentes aos vetores pSP64-*gfp*, pSP64-*DsRed* e *ddx4* 3'UTR foram recuperadas do gel. O fragmento de DNA correspondente a região *ddx4* 3'UTR foi ligado nos vetores pSP64-*gfp* e pSP64-*DsRed* com o uso da enzima T4 DNA ligase como descrito previamente. Os produtos das ligações foram transformados em bactérias DH-5α competentes por CaCl<sub>2</sub>, colônias de bactérias foram propagadas em meio LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina e os vetores recuperados por minipreparação (ver secção 4.5) Os vetores recuperados foram quantificados no por espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A construção dos vetores foi avaliada por mapa de restrição, sendo a clivagem realizada usando 1 µL de cada endonuclease (HindIII, XbaI e EcoRI), buffer 1X, 1 µg dos vetores em reação com volume final de 30 µL, seguindo as instruções do fabricante (Anza™, Invitrogen™). Os produtos de clivagem obtidos da reação foram visualizados em gel de agarose de 1% sob a exposição ao UV.

#### 4.8 SÍNTESE DE mRNA *in vitro*

Os vetores pSP64-*gfp*-Pm-*ddx4* 3'UTR e pSP64-*DsRed*-Pm-*ddx4* 3'UTR foram utilizados para síntese do mRNA *in vitro*. Para isso, foram utilizados 2 µg de cada construto, 2 µL da enzima EcoRI para a linearização do vetor em uma reação com volume final de 20 µL. O mRNA foi sintetizado *in vitro* utilizando um kit comercial mMMESSAGE MACHINE Kit® (AM 1340, Ambion®, Life Technologies™), de acordo com as instruções do fabricante. O mRNA sintetizado foi precipitado por LiCl e suspenso em 200 mM de KCl na concentração final de 100 ng/µL. A concentração e qualidade do mRNA foi avaliada no espectrofotômetro QIAxpert (Qiagen, Hilden,

Alemanha). O mRNA sintético foi separado em alíquotas de 10 µL e armazenados a -80°C em microtubos de 0,2 mL até seu uso na microinjeção.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES CELULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE PGCs *in vivo*

##### 4.9.1 Microinjeção de mRNA em zigotos de *P. mangurus* e espécies controle

Foi necessária a remoção enzimática de corion dos ovos recém fertilizados utilizando pronase (Sigma # SLMQ2345V, St. Louis, USA) diluídas nas respectivas soluções de manutenção embrionária para cada espécie, sendo 0,15% de pronase em solução de Characin (12 mM NaCl, 1 mM KCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) para as alíquotas de ovos de *P. mangurus* (~400), 0,05% de pronase em solução de Holtfreter (10 mM NaCl, 0,67 mM KCl, 0,90 mM CaCl<sub>2</sub> e 2,40 mM NaHCO<sub>3</sub>) para as alíquotas de *A. altiparanae* (~200), e 0,1% de pronase em solução salina Characin para as alíquotas de *P. lineatus* (~200). As concentrações de pronase usadas em curimba e lambari seguiram as recomendações de COELHO et al., 2019 e SILVA et al., 2016.

Todos os zigotos foram distribuídos em placas de Petri (100 x 20 mm) sendo homogeneizados nas respectivas soluções por movimentos circulares até a obtenção do 80% de zigotos sem corion, para posterior transferência dos zigotos nas placas de Petri cobertas por uma capa de ágar 1% em solução manutenção Characine (*P. lineatus* e *P. mangurus*) e Holtfreter (*A. altiparanae*). A remoção foi visualizada sob esteromicroscópio (SMZ18, Nikon®, Tóquio, Japão),

A microinjeção foi realizada utilizando micropipeta de boro-silicato com 10 µm de diâmetro (Drummond, Eugene, EUA) conectada a um microinjetor (CellTram vario, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), acoplado ao micromanipulador (M-152, Narishige, Tóquio, Japão) e efetuada sob esteriomicroscópio (SMZ18, Nikon®, Tóquio, Japão). Aproximadamente 10 nL da solução de mRNA de *ddx4* 3'UTR (*gfp-Pm-ddx4* 3'UTR/*DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR) foram microinjetadas nos ovos recém fertilizados sem corion no estágio de uma célula, para a identificação e acompanhamento da rota de migração das PGCs. A média de oócitos microinjetados foi obtido a partir de três repetições que

correspondem a três desovas diferentes. Foram utilizados ovos com corion e sem corion não injetados como os grupos controles, mantidos nas mesmas condições que os microinjetados.

#### **4.9.2 Identificação de PGCs *in vivo* no desenvolvimento embrionário de *P. mangurus* e espécies controle**

O desenvolvimento embrionário foi avaliado sob estereomicroscópio de fluorescência (Nikon SMZ18, Tóquio, Japão), e uso de câmera CCD (DS-Ri2, Nikon, Toquio, Japão). As imagens digitais foram capturadas usando o Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão). Foram analisadas a fertilização (no estágio de duas células), a sobrevivência durante as fases do desenvolvimento (clivagem, blástula, gástrula, segmentação, eclosão) e porcentagens de larvas normais e anormais. Em bagre sapo foram realizadas três repetições para cada gene repórter (*gfp/dsred*), enquanto que o mRNA *dsred-Pm-ddx4* 3'UTR foi microinjetado apenas em uma desova de *A. altiparanae* e *P. lineatus*.

#### **4.9.3 *Ddx4* 3'UTR de bagre sapo como marcador de PGCs nas espécies neotropicais**

As rotas migratórias de PGCs nas três espécies foram descritas a partir do início da visualização até o desaparecimento da fluorescência nas PGCs no estágio larval. Dois genes repórteres foram utilizados na marcação de PGCs para comparar a eficiência destes genes repórteres quanto a melhor identificação de PGCs. Também foram avaliados a porcentagem de marcação durante o desenvolvimento embrionário e o período (dias) que as fluorescências de GFP e Dsred em *P. mangurus* e *P. lineatus* e *A. altiparane* nas larvas.

A porcentagem de embriões com PGCs *gfp/dsred* positivas foi avaliada em dois estágios do desenvolvimento. A primeira avaliação foi realizada na fase de segmentação, momento em que a fluorescência das PGCs é diferenciada da fluorescência (ruído) observada nos outros tipos celulares, sendo considerado o número de embriões com PGCs marcadas por fluorescência e o número de embriões microinjetados. A segunda avaliação foi realizada na eclosão sendo considerado as

larvas PGCs *gfp/dsred* positivas e o número de larvas vivas. As avaliações de marcação foram feitas em triplicata para as espécies *P. lineatus* e *A. altiparane* utilizando o mRNA *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR. As imagens e tamanho de células de *P. mangurus* foram avaliadas no ImageJ.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SEMI-QUANTITATIVA E TECIDO ESPECÍFICA DE *ddx4* E *dnd1*

1 µg de RNA total de cada amostra das fases do desenvolvimento embrionário (ovo não fecundado até eclosão), larvas e tecidos de macho e fêmea (gônadas, cérebro, fígado, rim e músculo) foram tratadas com DNase I e utilizadas na síntese de cDNA, com o uso do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems #4368814, Vilnius, Lithuania). Os primers para a região codante dos mRNAs de *ddx4* e *dnd1* (Tabela 1) foram utilizados para a avaliação da expressão gênica, sendo utilizando como gene endógeno a  $\beta$ -actina (*actb*).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 30 µL. Os detalhes do procedimento estão descritos no apêndice A. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, usando os reagentes e volumes descritos no apêndice A.

Também foi realizado o alinhamento das sequências proteicas de Dnd1 e Ddx4 para identificar a identidade destas proteínas com as mesmas proteínas oriundas de outras espécies de teleósteos. Para o alinhamento múltiplo foram utilizadas as sequências de nucleotídeos da região codificadora de *dnd1* e *ddx4* de bagre sapo para a posterior inserção no programa Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a obtenção da sequência de aminoácidos. As sequências de Ddx4 e Dnd1 de bagre sapo foram alinhadas com as sequências das proteínas Ddx4 e Dnd1 de espécies da ordem siluriformes e characiformes obtidas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As regiões correspondentes aos motifs como os domínios foram determinadas pela plataforma Blastx e podem ser visualizadas no apêndice B. O alinhamento foi feito no programa MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as três espécies os dados obtidos do desenvolvimento embrionário e das avaliações de marcação foram apresentados como médias  $\pm$  erro-padrão. As médias foram resultantes de três repetições correspondentes a três desovas diferentes. Para a rastreabilidade em larvas de bagre sapo ( $n = 5$ ) os dados das PCGs foram apresentados como médias  $\pm$  erro-padrão. Os dados da comparação das rotas migratórias de PGCs dos embriões ( $n = 5$ ) de cada espécie foram apresentados como medias. Os dados foram verificados para a distribuição normal utilizando-se o teste de normalidade de Liliefors e, sucedida de ANOVA e teste de Tukey para a comparação múltipla entre as médias. Para todas as análises foi utilizada uma probabilidade de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 11 para Windows.

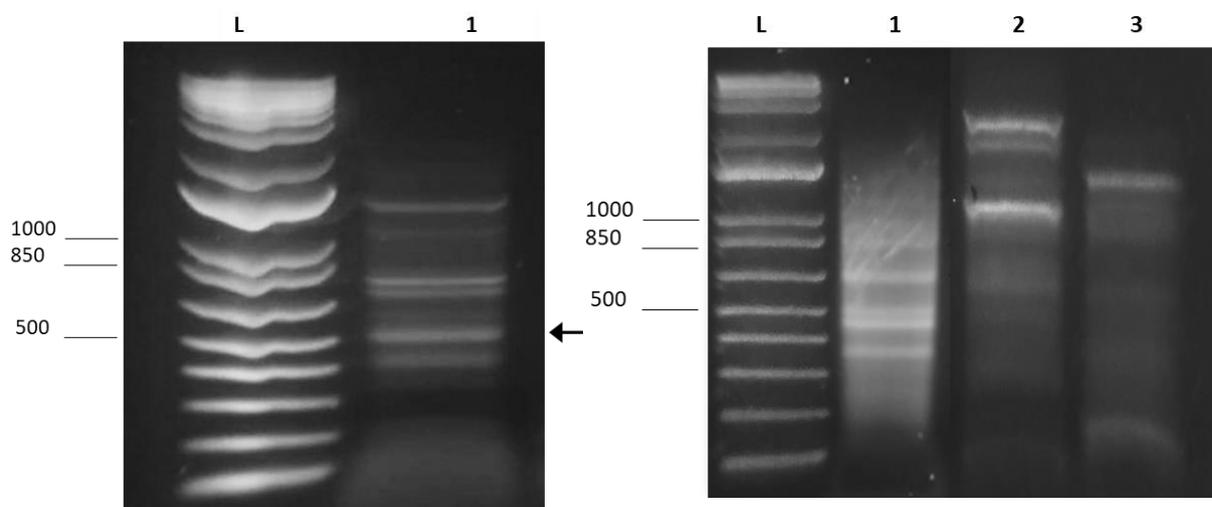
## 5. RESULTADOS

### 5.1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES 3'UTR DE *ddx4* E *dnd1*

O mRNA de *ddx4* de *P. mangurus* possui 2.685 nucleotídeos, sendo encontrados 158 na região 5'UTR, 2016 na região codificadora e 511 na região 3'UTR. O mRNA de *dnd1* é constituído por 1.972 nucleotídeos, sendo 264 localizados na região 5'UTR, 1.149 na região codificadora e 560 na região 3'UTR. As sequências do mRNA de *ddx4* e *dnd1* foram obtidas através do transcriptoma do ovo de *P. mangurus* (depositado no NCBI: BioProject ID: PRJNA819998).

A amplificação da região 3' UTR foi obtida no tamanho esperado, utilizando os primers GSP *ddx4* 3'UTR-F e o AUAP-R (Figura 3, A). Enquanto que para a região 3'UTR de *dnd1*, não foi obtida uma banda definida no tamanho esperado, utilizando os primers GSP *dnd1* 3'UTR-F e AUAP-R (Figura 3, B). Alternativamente, outros primers foram desenhados na tentativa de amplificação da região 3'UTR do *dnd1*. Uma estratégia foi desenhar primers amplificando parte da região codificadora junto com a região 3'UTR, para tal foi desenhado o primer GSP *dnd1* 3'UTR-F2 (TCTTCTTACTCCACCCTCTC) para um produto de amplificação com 950 pb. No entanto, o produto amplificado não correspondia ao *dnd1*. Outro primer foi desenhado após o início da região 3'UTR de *dnd1*, o primer GSP *dnd1* 3'UTR-F3 (TCATGTGTTTTGGGTGAG) para um produto de amplificação de 550 pb. A banda recuperada também não apresentava similaridade com a sequência de *dnd1*. Desta forma, a região 3'UTR de *dnd1* não foi possível de ser utilizada para a construção do vetor de transcrição.

Figura 3- Amplificação da região 3'UTR de *ddx4* e 3'UTR de *dnd1* utilizando cDNA da gônada de fêmea como molde. Visualização em gel de agarose a 1%.

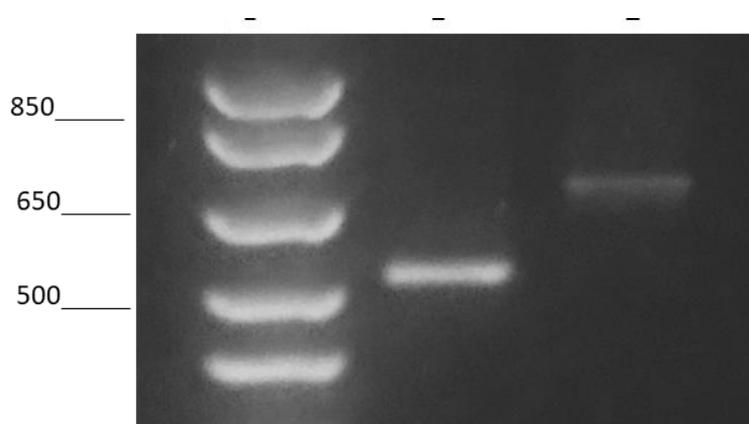


FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – **A-** (L) Ladder. (1) Amplificação do GSP da região 3'UTR com tamanho esperado de 520 pb. **B-** (L) Ladder. (1) Amplificação utilizando o primer GSP *dnd1* 3'UTR-F da região 3'UTR com tamanho esperado do amplicon de 560 pb. (2) Amplificação utilizando o primer GSP *dnd1* 3'UTR-F2 com tamanho esperado do amplicon de 950 pb. (3) Amplificação utilizando o primer GSP *dnd1* 3'UTR-F3 com tamanho esperado do amplicon de 550 pb.

A avaliação do construto pGEM-T--*ddx4* 3'UTR foi feita pela PCR, utilizando os primers GSP *ddx4* 3'UTR-F e AUAP-R e os primers T7 e SP6 promoter (Figura 4). Não foram obtidas similaridades de sequências entre os produtos de amplificação clonados, utilizando os diferentes primers desenhados, com a sequência 3'UTR de *dnd1* encontrada pelo transcriptoma do ovo de bagre sapo.

Figura 4- Amplificações da região 3'UTR de *ddx4* clonada no vetor pGEM-T easy (pGEM-T-*ddx4* 3'UTR), visualizadas em gel de agarose a 1%.



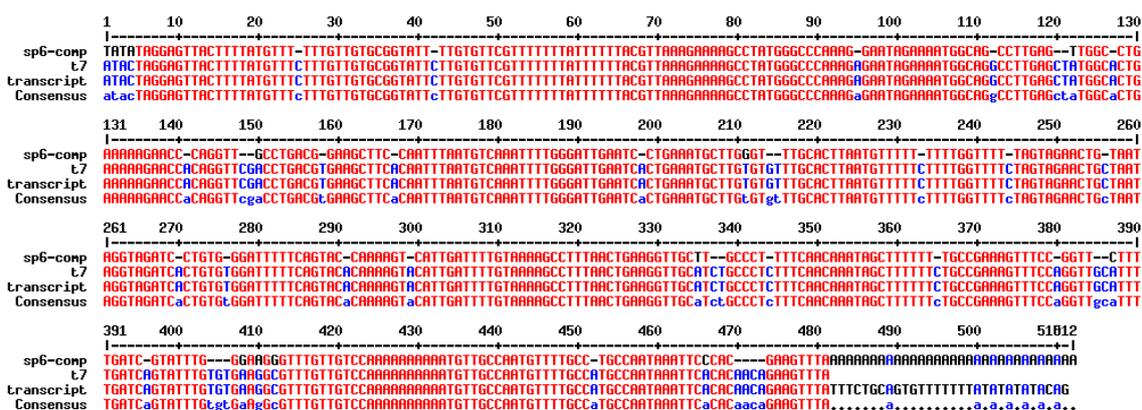
FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – (L) ladder. (1) amplificação obtida pelos primers GSP *ddx4* 3'UTR-F e AUAP-R no tamanho esperado de 520 pb. (2) amplificação obtida utilizando os primers T7 e SP6 promoter.

## 5.2 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES CLONADAS

A sequência de nucleotídeos obtida, após o sequenciamento do plasmídeo pGEM-T-ddx4 3'UTR, foi alinhada com o transcrito obtido pelo transcriptoma da região 3'UTR de *ddx4* (Figura 5), sendo obtida a confirmação da sequência completa da região 3'UTR de *ddx4* de *P. mangurus*. A sequência foi utilizada de entrada no programa BLASTN, sendo encontrado alta identidade, 81,85% e 75,20%, com as sequências da região 3'UTR de *ddx4* das espécies *Pangasianodon hypophthalmus* e *Tachysurus fulvidraco*, respectivamente (Figura 6). Esses dados indicam que a região utilizada para construção do vetor de transcrição é realmente a região 3'UTR de *ddx4* e que esta região parece ser bem conservada entre os siluriformes, como em *P. hypophthalmus* e *T. fulvidraco*.

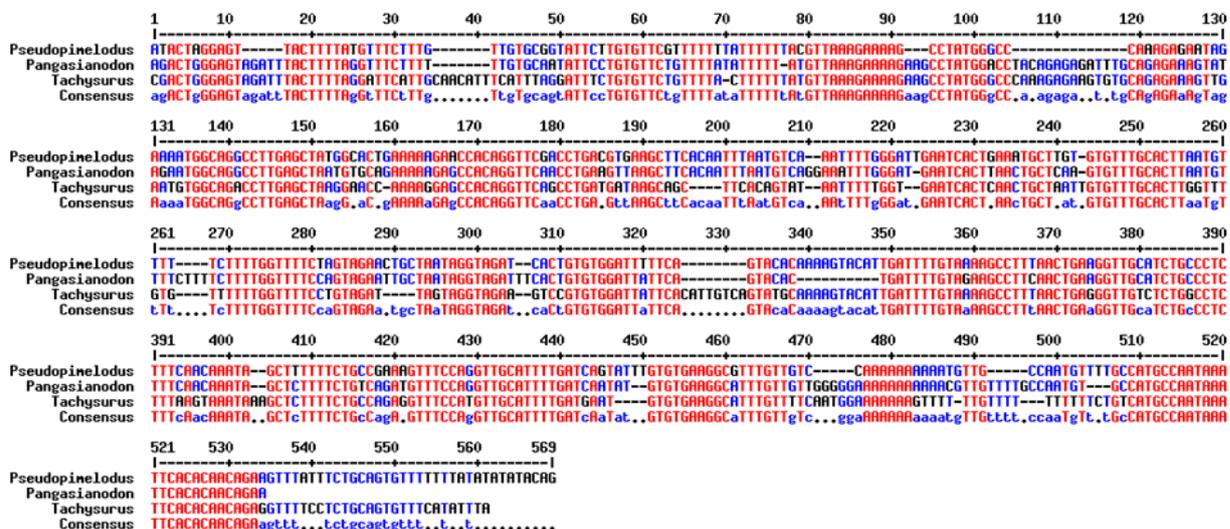
Figura 5 - Alinhamento das sequências de nucleotídicas da região 3'UTR de *ddx4* obtidas pelo sequenciamento, utilizando os primers SP6 e T7, com a sequência oriunda do transcriptoma do ovo de bagre sapo, utilizando o programa MultAlin



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda- Alinhamento realizado usando o programa MultAlin. Letras em vermelho evidenciam as regiões conservadas.

Figura 6- Alinhamento múltiplo da região 3'UTR de *ddx4* de *P. Mangurus* com a mesma região de outras espécies.



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

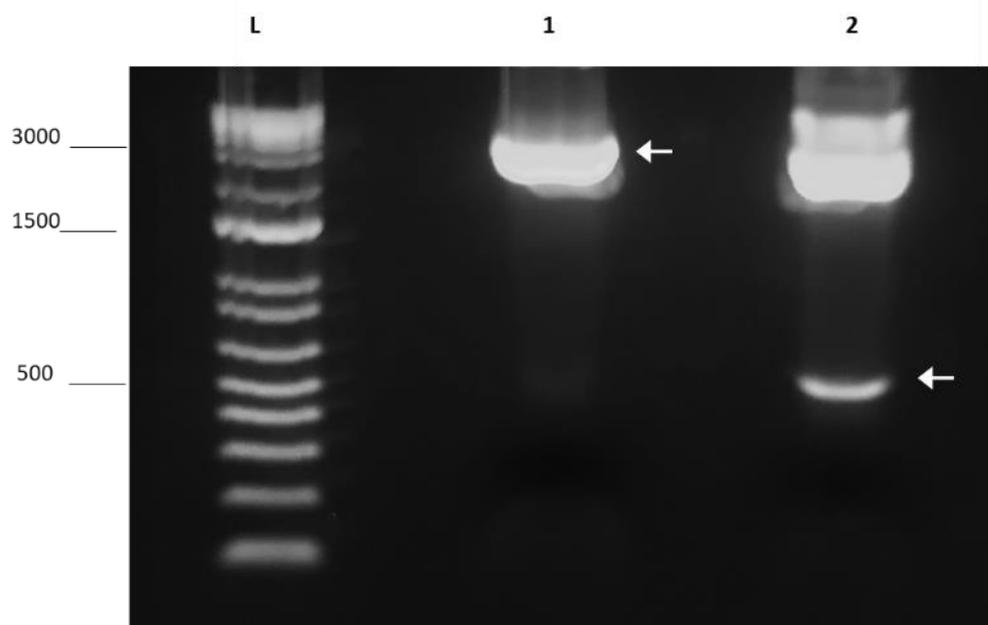
Legenda- Alinhamento realizado usando o programa MultAlin. Letras em vermelho evidenciam as regiões conservadas entre as diferentes espécies. Os IDs GenBank para *ddx4* usados foram: XM\_026941979.2 de *Pangasianodon hypophthalmus* e XM\_027141187.1 de *Tachysurus fulvidraco*.

### 5.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE TRANSCRIÇÃO COM AS REGIÕES 3'UTR DE *ddx4*

O construto (pGEM-T-*Pm-ddx4* 3'UTR contendo os sítios de restrição) e o vetor de transcrição pSP64-*gfp* foram clivados com as endonucleases. Os produtos da reação de clivagem, foram visualizados no gel de agarose a 1% (Figura 7). As bandas esperadas nos tamanhos de 3750 pares de bases (pb) e 511 pb que correspondem ao vetor pSP64-*gfp* e a região 3'UTR de *ddx4*, respectivamente, foram recuperadas do gel e ligados com T4 DNA ligase para a posterior clonagem.

Quatro colônias do novo construto pSP64-*gfp-Pm-ddx4* 3'UTR, foram recuperadas por miniprep e avaliadas no mapa de restrição apresentando se quatro bandas correspondentes ao vetor clivado (2951pb) por HindIII e EcoRI, uma banda de 726 pb que corresponde à GFP clivada por HindIII e XbaI, uma banda de 352pb de corresponde a 3'UTR *ddx4* Clivada por XbaI e EcoRI (Figura 8). A região 3'UTR de *ddx4* apresenta o sítio de restrição para HindIII que gerou uma segunda banda de aproximadamente 165 pb.

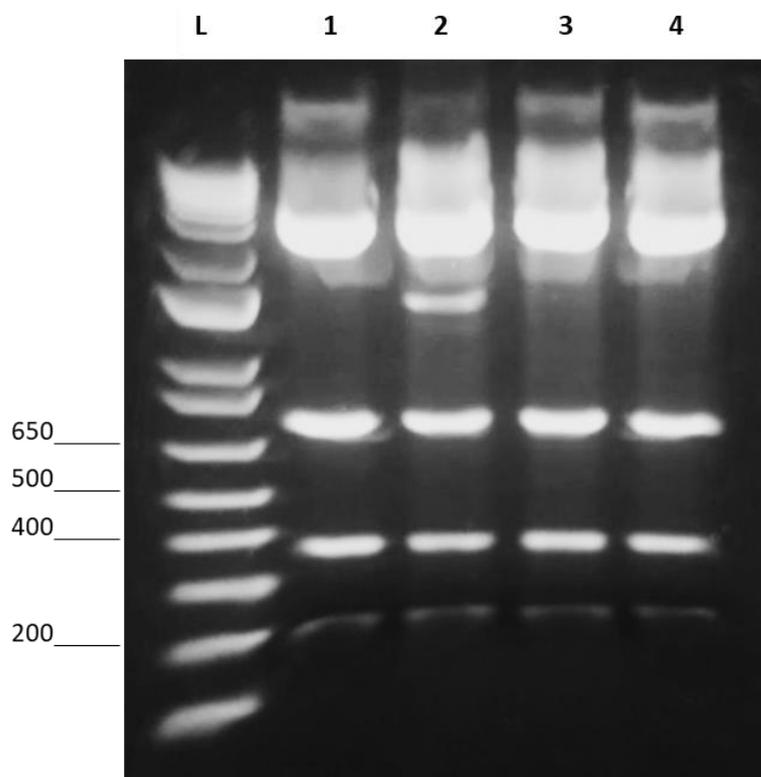
Figura 7- Visualização dos vetores clivados pPSP64-gfp e pGEM-T-Pm-ddx4 3'UTR. Clivados com as enzimas de restrição XbaI e EcoRI, observados em gel de agarose a 1%.



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – (L) ladder. (1) vetor pPSP64-gfp clivado. (2) vetor pGEM-T 3'UTR *ddx4* com enzimas após a clivagem. Pontas das setas sinalizam as bandas recuperadas.

Figura 8- Mapa de restrição do vetor de transcrição pSP64-gfp-Pm-ddx4 3'UTR após a clivagem com XbaI, HindII e EcoRI. Visualizado em UV, em gel de agarose a 1%.

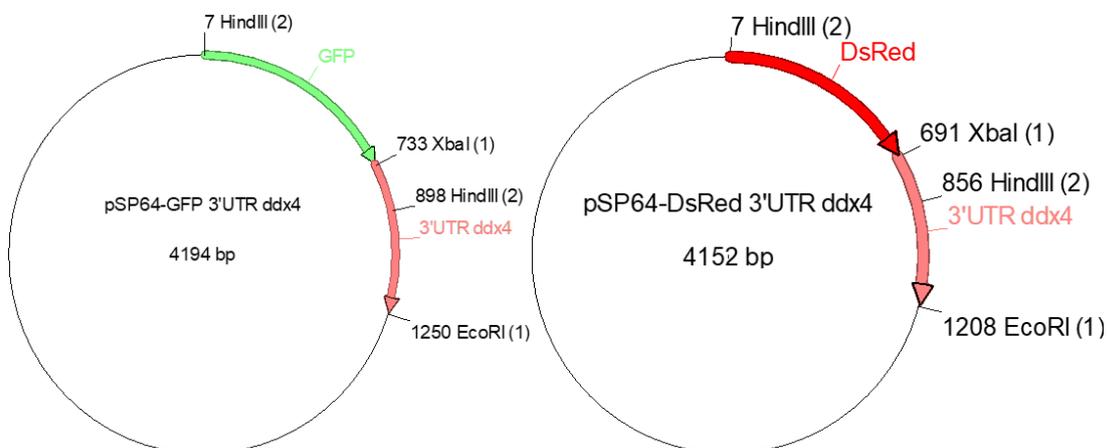


FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – (L) ladder. (1-4) vetor de transcrição pSP64-gfp-Pm-ddx4 3'UTR

Na Figura 9, é mostrado o mapa ilustrativo dos vetores construídos indicando os sítios de restrições.

Figura 9- Mapa dos vetores de transcrição construídos com o inserto de 3'UTR de *ddx4*



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – (A) pSP64 e a região codificadora de *gfp*. (B) pSP64 e a região codificadora de *DsRed*. Os sítios de restrições são mostrados nos mapas. Os mapas foram desenhados utilizando o programa *A plasmid editor (ApE)*.

A construção do vetor de transcrição pSP64-*DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR foi obtido com os mesmos procedimentos e enzimas de restrições da construção do vetor pSP64-*gfp-Pm-ddx4* 3'UTR. O mapa de restrição do vetor de transcrição usando a região codificadora de *DsRed* mostrou quatro bandas, sendo a banda correspondente ao vetor clivado de 2951 pb, a do gene repórter *DsRed* de 674 pb clivada por *HindIII* e *XbaI* e uma banda de 352 pb de correspondente a 3'UTR *ddx4* clivada por *XbaI* e *EcoRI*. A banda de 165 pb proveniente da região 3'UTR do *ddx4* clivada pela enzima *HindIII*,

Os vetores construídos pSP64-*DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR e pSP64-*gfp-Pm-ddx4* 3'UTR, utilizando a região 3'UTR do mRNA de *ddx4* de bagre sapo, foram utilizados para síntese *in vitro* dos mRNAs denominados *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR e *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR suspensos em 200 mM de KCl na concentração final de 100 ng/μL.

## 5.4 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES CELULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE PGCs *in vivo*

### 5.4.1 Identificação de PGCs *in vivo* no desenvolvimento embrionário de *P. mangurus*

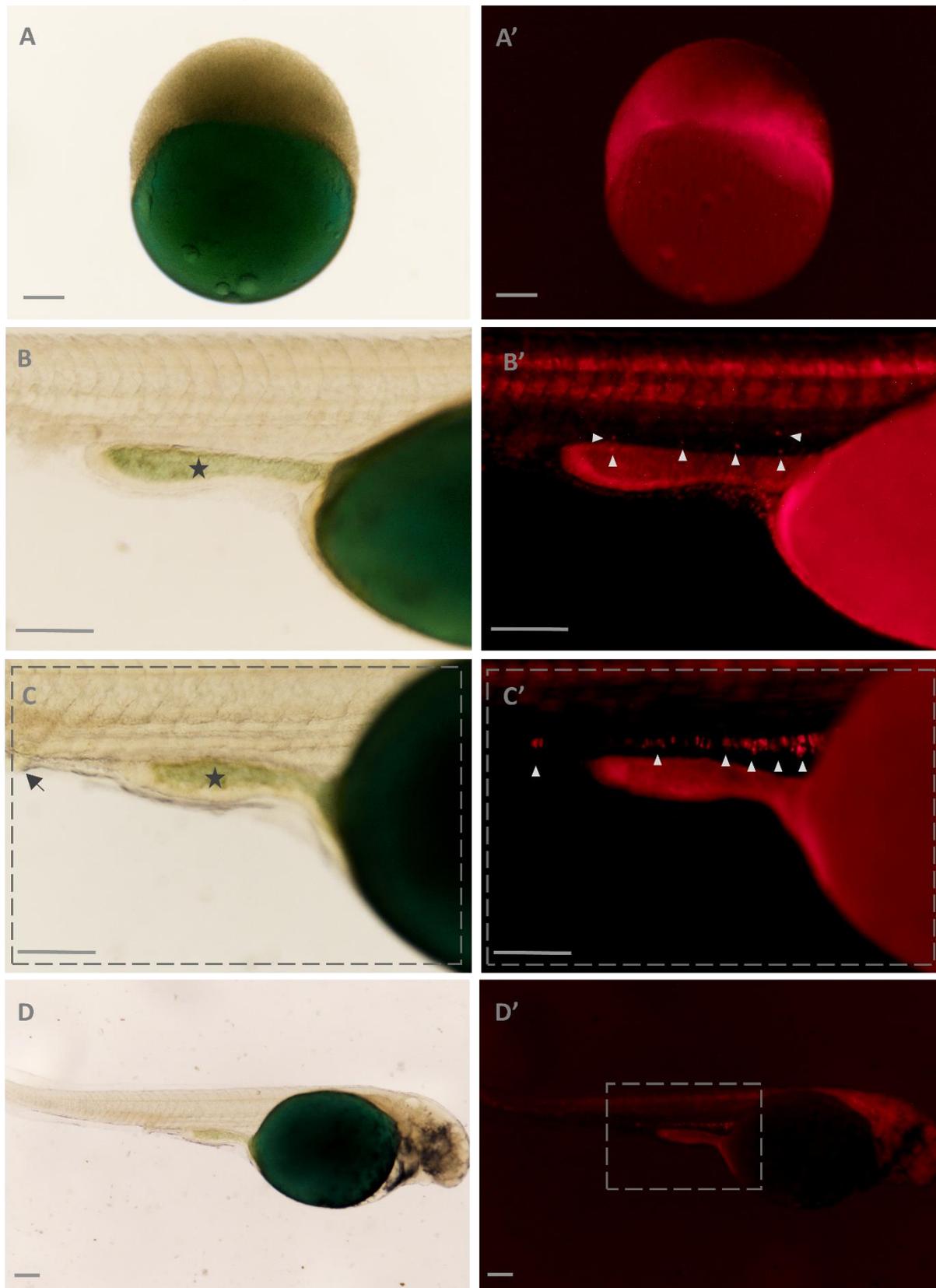
O início da detecção da fluorescência de DsRed/GFP nos embriões de *P. mangurus*, ocorreu no estágio de blástula (Figura 10 A, A'), sendo que aparentemente, os embriões com DsRed apresentavam maior intensidade de fluorescência do que os embriões contendo a GFP. No entanto, foi observada o aumento na intensidade da fluorescência das duas proteínas repórteres apenas no início da fase de gástrula. A identificação de PGCs *in vivo* nos embriões de *P. mangurus* foi obtida através da análise de microscopia de fluorescência da proteína DsRed, em ovos microinjetados com o mRNA dsred-Pm-ddx4 3'UTR.

Durante a segmentação inicial (6-10 somitos) não foram evidenciadas as PGCs e 19 horas após a fertilização (hpf), na fase de segmentação final com 28 somitos, previamente a eclosão, PGCs-DsRed positivas foram visualizadas no plano lateral acima da extensão do vitelo, na região medial do embrião, em sentido ao eixo dorsal-caudal dos embriões entre sétimo e decimo primeiro somitos (Figura 10 B, B'). Durante o acompanhamento na segmentação com 28 somitos as PGCs-DsRed positivas se encontram distribuídas individualmente, e em alguns embriões, as PGCs se concentraram na região precursora a crista gonadal. Os experimentos foram realizados a 25°C e a eclosão ocorreu em 20 hpf, quando os embriões apresentavam de 29 a 30 somitos (Figura 10, C', D'). O rápido desenvolvimento das larvas de bagre-sapo permitiu observar a diferenciação das estruturas do trato digestório 2 horas após a eclosão (hpe), no início do período larval (22 hpf). Neste período, as PGCs estavam localizadas acima da região precursora do tubo digestório, abaixo dos somitos entre o sétimo até decimo quinto somito (Figura 11 A, A'). Alguns embriões apresentaram PGCs com menor intensidade de fluorescência nas regiões correspondentes descritas acima.

Durante o acompanhamento da rota de migração das PGCs, no primeiro dia após a eclosão (dpe), após 46 hpf, as PGCs distribuídas acima do intestino primitivo se deslocaram ligeiramente entre o oitavo e decimo primeiro somito, além disso

tornaram se mais evidentes devido a diminuição da fluorescência (background) das células somáticas, (Figura 11 B, B'). O embrião que apresentou PGCs entre o sétimo e o decimo quinto somito durante a eclosão não sobreviveu até o 1 dpe. Nesta fase (1 dpe), as PGCs DsRed-positivas encontravam-se separadas determinado se o tamanho em média de 25  $\mu\text{m}$ , igual ao apresentado durante as 19 hpf. Após este período, as PGCs foram observadas com menor intensidade de fluorescência, e no 2 dpe (70 hpf) não foi possível visualizar as PGCs-DsRed positivas nas larvas, evidenciando a rápida degradação do mRNA nas PGCs assim como ao aumento da pigmentação externa dos animais dado ao rápido crescimento das larvas de bagre sapo.

Figura 10- Início da expressão dos genes repórter e visualização de PGCs *in vivo* durante o desenvolvimento embrionário de *P. mangurus*, pela microinjeção do mRNA sintético *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR, sob estereomicroscópio em luz normal e fluorescência.

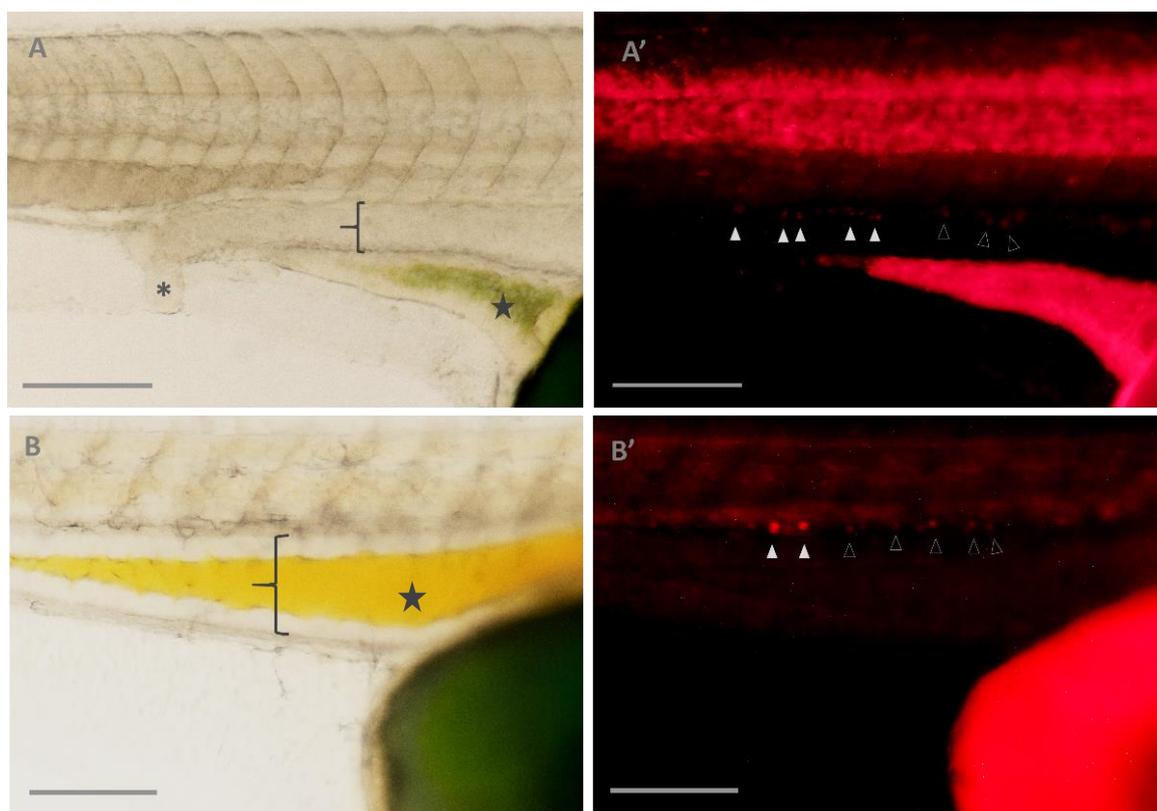


FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – Legenda – **A, A'**- Embrião em fase de blástula com luz normal e sob fluorescência respectivamente. **B, B'**- Embrião em fase de segmentação com 28 somitos (19 hpf) com luz normal e

sob fluorescência respectivamente. **C, C'** Embrião em fase de segmentação com 30 somitos (20 hpf) com luz normal e sob fluorescência respectivamente. **D, D'**- embrião em menor aumento região magnificada em C e C' com luz normal e sob fluorescência, respectivamente. As pontas das setas brancas sinalizam as PGCs. Estrela sinaliza a extensão do vitelo. Seta cinza sinaliza abertura anal em formação. A barra representa 200  $\mu\text{m}$ .

Figura 11- Visualização de PGCs *in vivo* em larvas de *P. mangurus* após a eclosão e no primeiro dia após a eclosão, pela microinjeção do mRNA sintético *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR, sob estereomicroscópio em luz normal e fluorescência



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – **A, A'**- larva com 30 somitos (22 hpf) visualizada sob luz normal e fluorescência, respectivamente. Pontas das setas sinalizam as PGCs. Setas pretas com borda branca sinalizam PGCs com menor intensidade de fluorescência. Colchete sinaliza o tubo digestor primitivo. Asterisco sinaliza a abertura anal em formação. Estrela indica a redução da extensão do vitelo. **B, B'**- larva de 1 dpe com 32 somitos (46 hpf) com luz normal e sob fluorescência, respectivamente. As pontas das setas sinalizam as PGCs. Setas pretas com borda branca sinalizam PGCs com menor intensidade de fluorescência. Colchete sinaliza o tubo digestório primitivo mais desenvolvido. Estrela indica mucos no aparato digestório. A barra representa 200  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.2 *Ddx4* 3'UTR de bagre sapo como marcador de PGCs nas espécies neotropicais

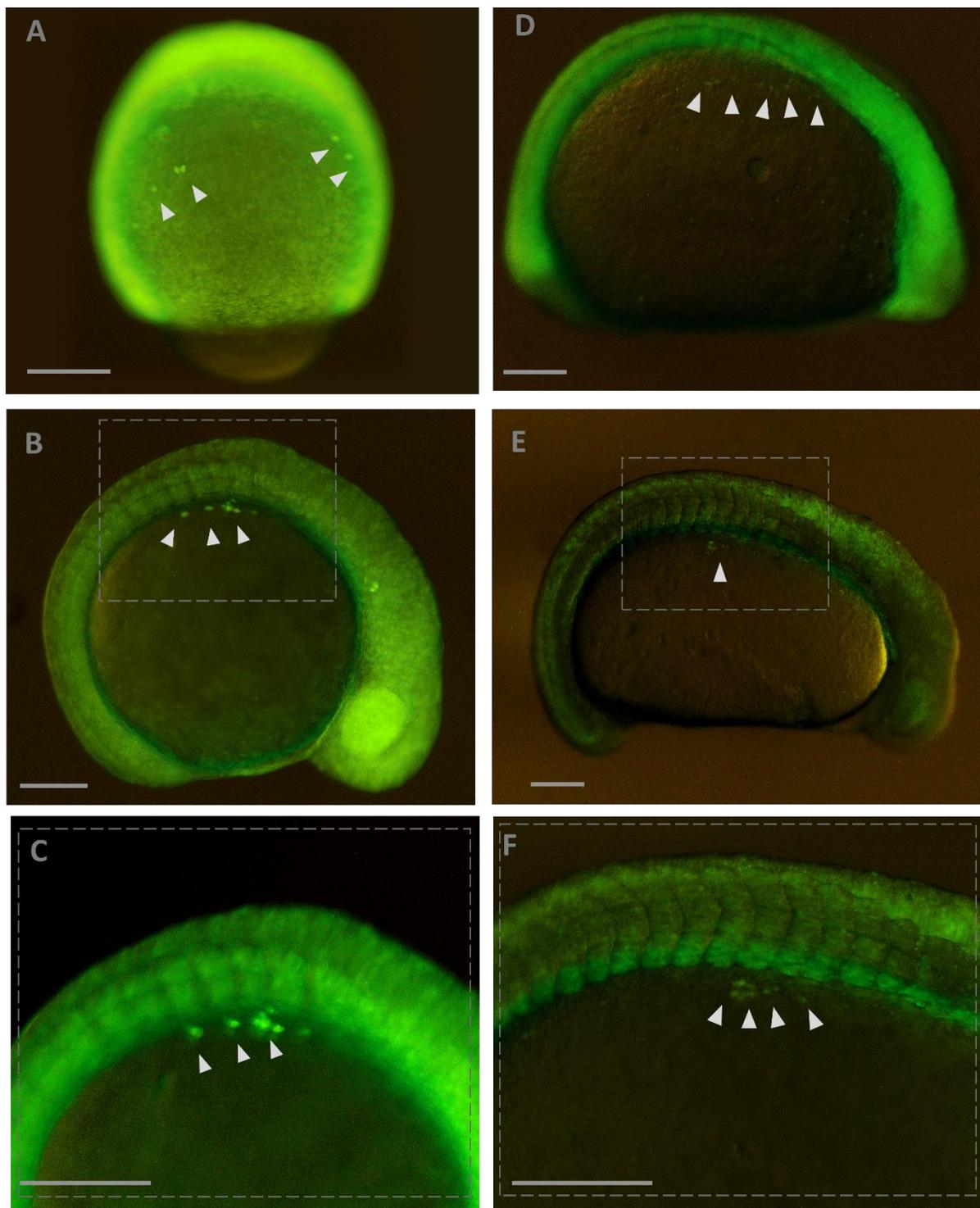
Para avaliar se a região 3'UTR do mRNA de *ddx4* de bagre sapo era funcional para a marcação de PGCs, bem como se esta região era conservada para diferentes espécies, os mRNAs sintéticos produzidos foram microinjetados em ovos recém fecundados de *A. altiparanae* e *P. lineatus*. Em embriões de *A. altiparanae*

microinjetados com o mRNA *gfp-Pm-ddx4 3'UTR*, a visualização das PGCs foi inicialmente observada durante a fase de gástrula com 70% de epibolia (Figura 12 A). O número de PGCs durante esta fase foi entre 4-5 células, localizando-se no epiblasto, as quais conforme ao avanço dos movimentos de convergência, as PGCs se deslocaram lateralmente em direção à placa neural em formação durante a fase de gástrula com um 90% de epibolia. Os detalhes do padrão migratório das PGCs no desenvolvimento embrionário de lambari encontram-se no apêndice C.

Após a formação da notocorda as PGCs se distribuíram acima do saco vitelino à ambos lados dos somitos e foram bem definidas durante a migração graças à diminuição do background na fase de segmentação com 10 somitos (Figura 12 B, C). Em *P. lineatus*, as PGCs foram visualizadas com menor intensidade de fluorescência durante a fase de segmentação com 6 somitos, quando os zigotos foram injetados com *gfp-Pm-ddx4 3'UTR* (Figura 12 D). Similarmente aos dados obtidos com lambari, a melhor identificação das PGCs só foi possível com o avanço do desenvolvimento embrionário (Figura 12 E, F). Nas larvas marcadas com DsRed foi observado maior background, dificultando a efetiva visualização das PGCs em gástrula 70% de epibolia e segmentação com 6 somitos, sendo possível identificar as PGCs-Dsred positivas nos embriões na fase de segmentação com mais de 15 somitos em ambas espécies.

A marcação de PGCs pela microinjeção do mRNA *DsRed-Pm-ddx4 3'UTR* resultou em melhor definição das PGCs nas 3 espécies, durante a fase de segmentação final e na eclosão (Figura 13). No entanto, na análise das rotas migratórias das PGCs, a observação da duração da fluorescência foram feitas usando o marcador que propiciou a visualização das PGCs mais precocemente, sendo GFP para curimba e lambari e DsRed para bagre sapo, pois nos embriões de bagre sapo que foram microinjetados com o mRNA contendo o reporter GFP, não foi possível a identificar as PGCs durante a segmentação final devido à baixa intensidade de fluorescência nas PGCs e alto background de fluorescência nas células somáticas (Figura 13). Isso dificultou a identificação das PGCs nos embriões e nas larvas recém eclodidas. Além disso, as larvas com PGCs-GFP positivas não apresentaram fluorescência 1 dpe.

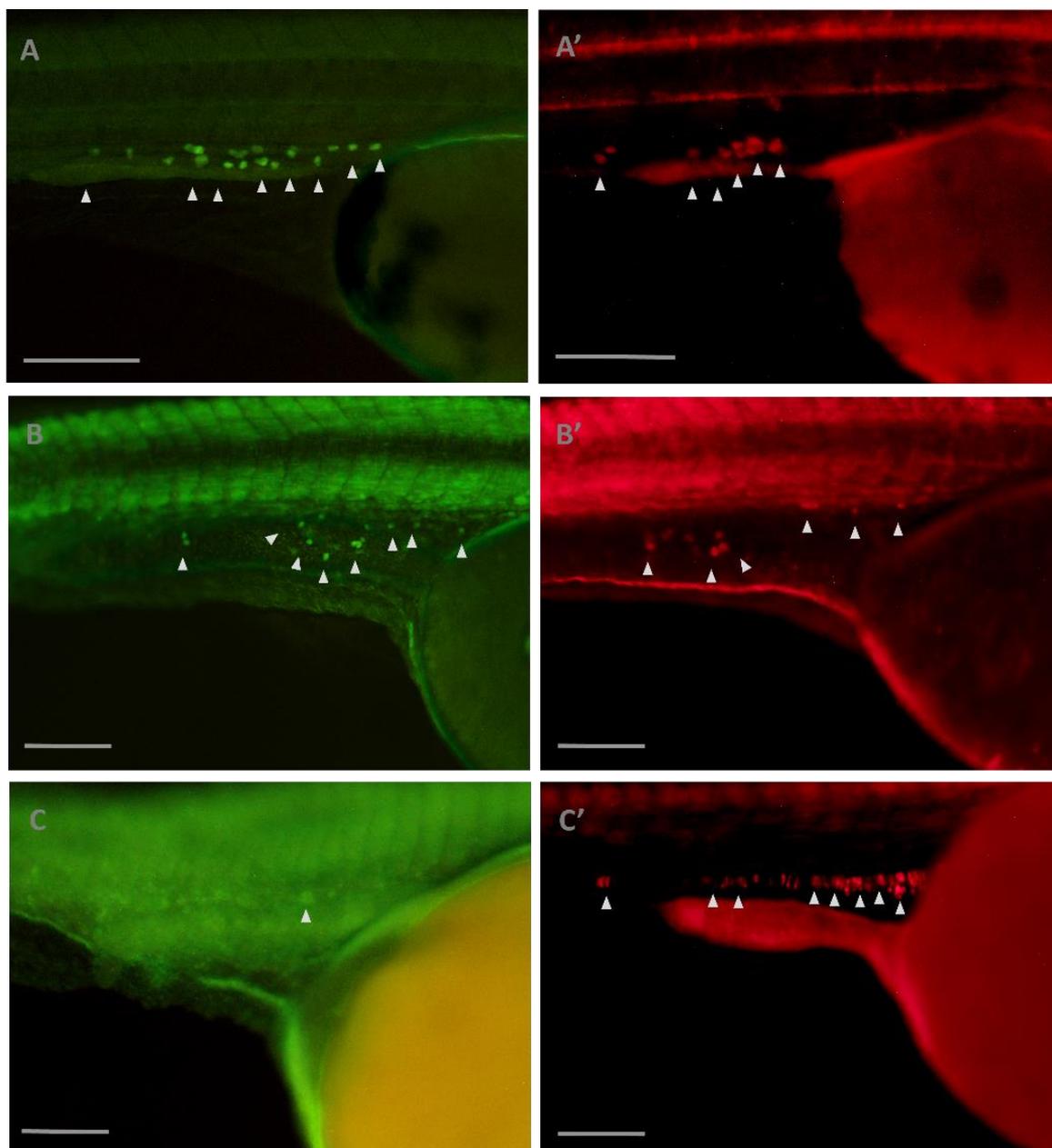
Figura 12- Início da visualização de PGCs em larvas de *A. altiparanae* e *P. lineatus* pela microinjeção do mRNA *gfp-pm-ddx4* 3'UTR, sob estereomicroscópio com fluorescência.



ONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – **A, B, C**-- Embrião de *A. altiparanae*. **A** -Embrião em fase de gástrula com 70% de epibolia. **B**- Embrião com 10 somitos. **C** - Área magnificada da quadricula em **B**. **D, E, F** -Embrião de *P. lineatus*. **D** – Embrião com 6 somitos. **E**- Embrião com 12 somitos. **F**- Área quadricula em **E** amplificada. Pontas das setas brancas indicam as PGCs. A barra representa 200  $\mu$ m.

Figura 13- Diferenças na intensidade de fluorescência (GFP/DsRed) nas PGCs de *P. mangurus*, *P. lineatus* e *A. altiparanae* durante a eclosão. Embriões microinjetados com os mRNAs *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR e *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR, sob fluorescência



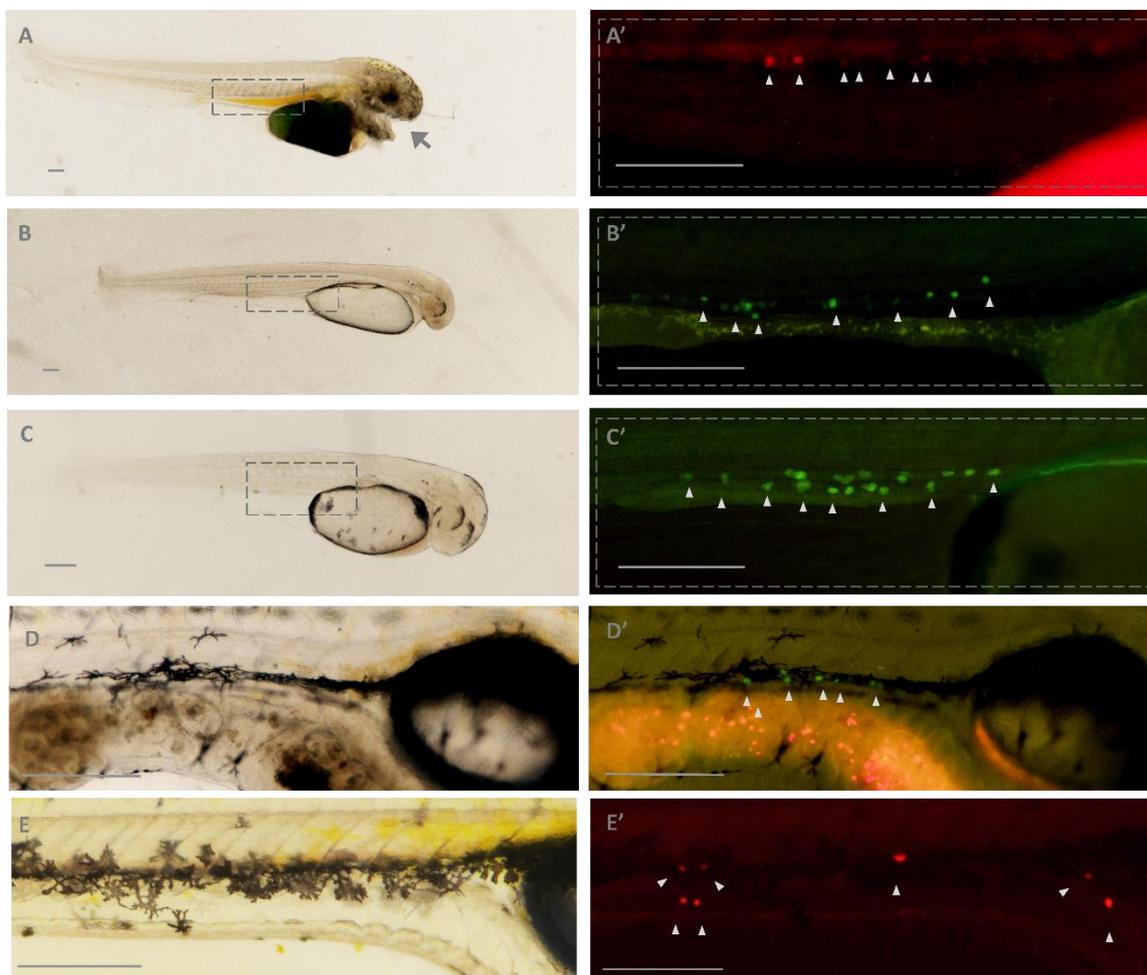
FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – **A, A'**-Larva recém eclodida de *A. altiparanae*, **B, B'**- Larva recém eclodida de *P. lineatus*. **C, C'**- Larva recém eclodida de *P. mangurus*. Pontas das setas brancas indicam as PGCs. A barra representa 200  $\mu$ m.

Após a eclosão, foi feito o acompanhamento das larvas com PGCs-GFP/Dsred positivas ( $n = 5$ ), sendo observada a diminuição do background 1 dpe (Figura 14). Além disso observou-se o rápido desenvolvimento dos sistemas orgânicos das larvas de *P. mangurus* 1 dpe, em relação aos Characiformes utilizados, tais como a presença de muco no tubo digestor em desenvolvimento, a pigmentação externa das larvas (olho e cabeça) e a definição da estrutura bucal em formação. Estes acontecimentos

podem estar relacionados com o fato de não ser mais observada as PGCs após este período.

Figura 14- Duração da intensidade de fluorescência nas PGCs em larvas de *P. mangurus*, *P. lineatus* e *A. altiparanae* a partir do 1 dpe até a desaparecimento da fluorescência. Embriões microinjetados com os mRNAs *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR e *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR, sob estereomicroscópio



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

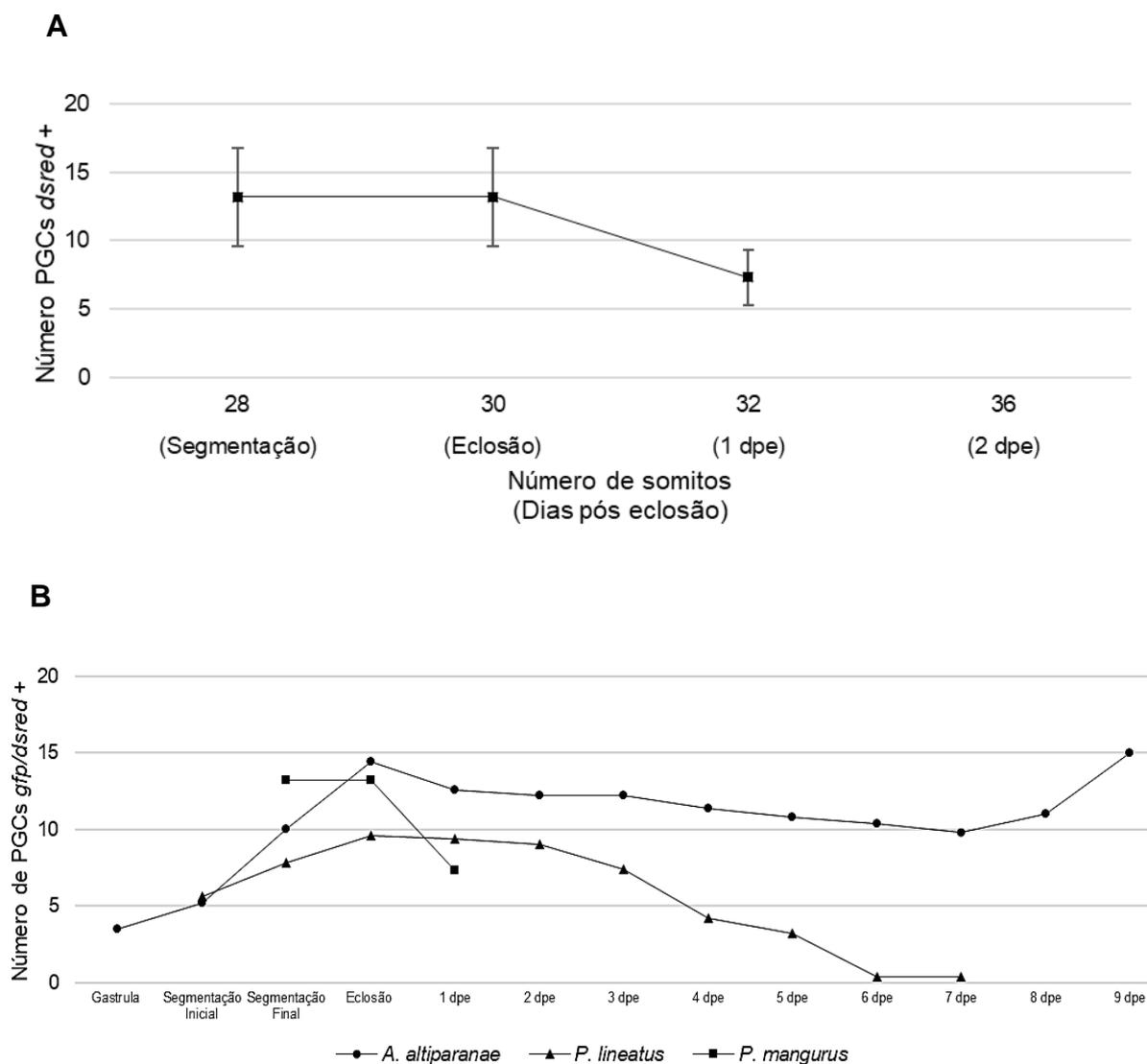
Legenda – **A**, - Larva de *P. mangurus* 1 dpe sob luz normal e fluorescência. **B** - Larva de *P. lineatus* 1 dpe sob luz normal e fluorescência. **C** - Larva de *A. altiparanae* 1 dpe sob luz normal e fluorescência. **A'**, **B'**, **C'**- áreas magnificadas das quadriculas em **A**, **B**, **C**. **D**, **D'** - Área amplificada da região da crista gonadal da larva de *A. altiparanae* com 9 dpe sob luz normal e fluorescência. **E**, **E'**- Área amplificada da região da crista gonadal da larva de *P. lineatus* 7 dpe sob luz normal e fluorescência. Pontas das setas brancas indicam as PGCs. Seta cinza indica a boca em formação. A barra representa 250 μm.

O acompanhamento das larvas permitiu evidenciar o período em que as PGCs podem ser ainda observadas pela fluorescência com o avanço dos dias de desenvolvimento. Nas larvas de *A. altiparanae* as fluorescências da GFP e Dsred foram observadas durante 9 dpe (Figura 14 D, D'), enquanto nas larvas de *P. lineatus*, a fluorescência da GFP e Dsred foram observadas até 7 dpe (Figura 14 E, E').

Em bagre sapo foi avaliado o número de PGCs a partir da primeira visualização e durante a migração, bem como o período de visualização o da fluorescência do

DsRed em larvas de *P. mangurus* nas PGCs. Para *P. mangurus* o acompanhamento em larvas só foi possível quando os zigotos foram microinjetados com o construto que contendo o DsRed, sendo observada a diminuição do número de PGCs após a eclosão (Figura 15, A). A comparação do início da visualização e o período de visualização da fluorescência nas PGCs, definiu-se quatro momentos de análises de visualização de PGCs, sendo o primeiro durante a fase de gástrula com 70% de epibolia, segmentação inicial (de 6 a 15 somitos), segmentação final quando o vitelo começa se estender (mais de 16 somitos) e durante a eclosão (Figura 15, B). Nas espécies de Characiformes verificou-se a proliferação celular durante o desenvolvimento embrionário e o decaimento visual da intensidade de fluorescência no número médio PGCs nas larvas conforme ao avanço dos dias. A fluorescência nas PGCs não foi mais observada no 8 dpe em curimba, enquanto que em lambari foi observada fluorescência até o 9 dpe, com o início da proliferação das PGCs (Figura 15, B).

Figura 15- Número médio PGCs-DsRed positivas de *P. mangurus*, e PGCs-GFP positivas de *A. altiparanae* e *P. lineatus* marcados pela microinjeção de mRNA sintético durante o desenvolvimento embrionário até a fase larval. Embriões e larvas mantidos a 25°C.



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda- **A**- Número médio de PGCs de bagre sapo durante o início da visualização até a fase larval ainda possível de observar as PGCs por fluorescência. **B**- Comparação do número médio PGCs de *P. mangurus*, *A. altiparanae* e *P. lineatus* a partir do início da visualização até período larval que as PGCs ainda são possíveis de serem observadas.

Em bagre sapo, um total de 521 zigotos (oriundos de três repetições) foram micronjetados usando o gene repórter *dsred*, obtendo 3% de PGCs-DsRed positivas durante a fase de segmentação final, porcentagem obtida a partir do número de microinjetados. A partir da eclosão ( $n = 59$ ),  $29 \pm 0,16\%$  das larvas apresentaram PGCs-DsRed positivas. Além disso, duas outras das larvas de 1 dpe, que não haviam mostrado PGCs fluorescentes anteriormente, evidenciaram PGCs-DsRed positivas, acrescentando 3,3% na marcação de PGCs em larvas, sendo a marcação total de

PGCs após a eclosão de 32,3%. Resultados semelhantes foram obtidos quando 547 oócitos recém fertilizados de bagre sapo foram microinjetados com o mRNA *gfp-pm-ddx4* 3'UTR. Durante a eclosão, a porcentagem de marcação de PGCs-GFP positivas foi de 3%. No entanto, um dia após eclosão, não foi possível observar PGCs fluorescentes nas larvas. Não foi observada diferença significativa na marcação final e sobrevivência dos embriões microinjetados com *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR ou *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR.

Em *A. altiparanae* foram microinjetados 512 zigotos obtendo-se  $29 \pm 0,03\%$  de marcação até a eclosão e partir das larvas vivas após a eclosão ( $n = 260$ ) um  $59 \pm 0,14\%$  das larvas apresentaram PGCs-GFP positivas. Em *P. lineatus* foram microinjetados 253 zigotos, obtendo  $16 \pm 0,00\%$  de marcação até a eclosão e nas larvas após a eclosão ( $n = 66$ ),  $72 \pm 0,16\%$  apresentaram PGCs-GFP positivas. A visualização do maior número de embriões com PGCs marcadas foi observado na fase da segmentação final (Tabela 2), nas três espécies.

A porcentagem de sobrevivência na eclosão (Tabela 3) dos embriões de *P. mangurus* microinjetados foi de  $12,2\% \pm 1,8$ , demonstrando a sensibilidade dos embriões à micromanipulação, quando comparado com o controle sem córion ( $31,7\% \pm 4,7$ ) e controle com córion ( $72,5 \pm 5,9$ ), apresentando diferença significativa ( $p = 0,006$ ) entre o tratamento microinjetado com *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR mRNA e os grupos controles. Em relação a larvas normais e anormais, não foi observada diferença significativa entre os embriões microinjetados e os controles.

Nos Characiformes, a sobrevivência na eclosão foi de  $52,0 \pm 5,7\%$  em *A. altiparanae* (Tabela 4), valor próximo ao controle sem córion ( $64,9 \pm 5,3\%$ ) e com corion ( $71,7 \pm 4,371\%$ ) enquanto que em *P. lineatus*  $26,3 \pm 6,5\%$  sobreviveram na eclosão (Tabela 5), sendo semelhante ao controle sem córion ( $31,1 \pm 1,9\%$ ) e com corion ( $64,2 \pm 10,5\%$ ). Portanto, para ambas espécies não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos microinjetados e os grupo controle. A taxa de larvas normais e anormais não foi influenciada pela remoção do córion e ou com microinjeção, mantendo-se nos mesmos valores para todos os grupos.

Tabela 2- Porcentagem de embriões com PGCs marcadas pela microinjeção de mRNA sintético durante o desenvolvimento embrionário de *A. altiparanae*, *P. lineatus* e *P. mangurus*

Porcentagem de embriões com PGCs							Porcentagem de larvas com PGCs
Espécie	Número Injetados	Repórter	Gástrula 70% epibolia (%)	Segmentação inicial (%)	Segmentação final (%)	Total eclosão (%)	Larvas marcadas (%)
<i>A. altiparanae</i>	512	<i>gfp</i>	2 ± 0,00	12 ± 0,03	16 ± 0,06	29 ± 0,03	59 ± 0,14 (71/260)
<i>P. lineatus</i>	253	<i>gfp</i>	-	6 ± 0,00	11 ± 0,01	16 ± 0,00	72 ± 0,16 (41/66)
<i>P. mangurus</i>	547	<i>gfp</i>	-	-	-	3 ± 0,00	23 ± 0,05 (18/88)
<i>P. mangurus</i>	521	<i>dsred</i>	-	-	3 ± 0,01	3 ± 0,01	29 ± 0,16 (18/59)

Tabela 3- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de *P. mangurus*, microinjetados com *DsRed-Pm-ddx4* 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Characin. Os controles com córion (CCC) e sem córion (CSC) mantidos nas mesmas condições.

	Total	Não Fertilizados (%)		Clivagem (%)		Blástula (%)		Gástrula (%)		Segmentação (%)		Eclosão (%)		Normal (%)		Anormal (%)	
CCC	225	22,6	± 0,1	77,9	± 8,2	82,6	± 5,1	80,8	± 5,1	79,0 <sup>a</sup>	± 5,0	72,5 <sup>a</sup>	± 5,9	92,6	± 4,2	7,4	± 4,2
CSC	241	20,1	± 0,1	79,9	± 10,1	73,6	± 4,1	71,4	± 4,7	65,9 <sup>ab</sup>	± 6,0	31,7 <sup>b</sup>	± 4,7	84,7	± 4,7	15,3	± 4,7
DsRed	521	32,0	± 0,1	82,6	± 8,4	82,0	± 5,0	77,7	± 8,2	42,0 <sup>b</sup>	± 3,4	12,2 <sup>b</sup>	± 1,8	71,6	± 8,4	28,4	± 8,4
<b>p-value</b>		0,946		0,946		0,508		0,669		0,013		0,0006		0,213			

Valores de  $p < 0,05$  indicam diferença significativa entre os grupos controles e grupo experimental em cada estágio de desenvolvimento.

Tabela 4- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de *P. mangurus*, microinjetados com *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Characine. Os controles com corion (CCC) e sem corion (CSC) mantidos nas mesmas condições

	Total	Não Fertilizados (%)		Clivagem (%)		Blástula (%)		Gástrula (%)		Segmentação (%)		Eclosão (%)		Normal (%)		Anormal (%)	
CCC	301	18,1	± 0,1	81,9	± 10,4	81,0	± 6,5	79,5	± 6,7	73,4 <sup>a</sup>	± 9,3	68,1 <sup>a</sup>	± 11,4	92,6 <sup>a</sup>	± 4,3	7,4	± 4,3
CSC	284	23,1	± 0,1	76,9	± 10,6	75,7	± 7,2	69,7	± 9,5	53,9 <sup>ab</sup>	± 1,4	32,1 <sup>b</sup>	± 5,4	72,0 <sup>b</sup>	± 1,7	28,0	± 1,7
GFP	547	32,0	± 0,1	66,1	± 0,8	59,1	± 5,7	44,5	± 10,7	33,7 <sup>b</sup>	± 7,8	15,4 <sup>b</sup>	± 2,1	74,8 <sup>b</sup>	± 5,2	25,2	± 5,2
<b>p-value</b>		0,583		0,583		0,206		0,153		0,047		0,016		0,049			

Valores de  $p < 0,05$  indicam diferença significativa entre os grupos controles e grupo experimental em cada estágio de desenvolvimento.

Tabela 5- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de *A. altiparanae*, microinjetados com *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Holtfreter. Os controles com córion (CCC) e sem córion (CSC) mantidos nas mesmas condições

	Total	Não Fertilizados (%)		Clivagem (%)		Blástula (%)		Gástrula (%)		Segmentação (%)		Eclosão (%)		Normal (%)		Anormal (%)	
CCC	225	5,2	± 0,0	94,8	± 3,6	89,6	± 3,8	84,9	± 5,5	79,7	± 5,6	71,7	± 4,3	94,8	± 5,2	7,2	± 3,7
CSC	299	3,5	± 0,0	96,5	± 1,5	88,6	± 4,1	79,6	± 8,3	77,6	± 7,3	64,9	± 5,3	90,8	± 1,0	9,2	± 1,0
GFP	512	5,1	± 0,0	94,9	± 3,2	86,2	± 5,5	68,2	± 3,7	57,9	± 2,2	52,0	± 5,7	83,4	± 8,0	14,8	± 2,7

Não houve diferença significativa entre os grupos controles e grupo experimental em cada estágio de desenvolvimento ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6- Sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário e normalidade das larvas de *P. lineatus* microinjetados com *gfp-pm-ddx4* 3'UTR mRNA, mantidos em solução de Characin. Os controles com córion (CCC) e sem córion (CSC) mantidos nas mesmas condições

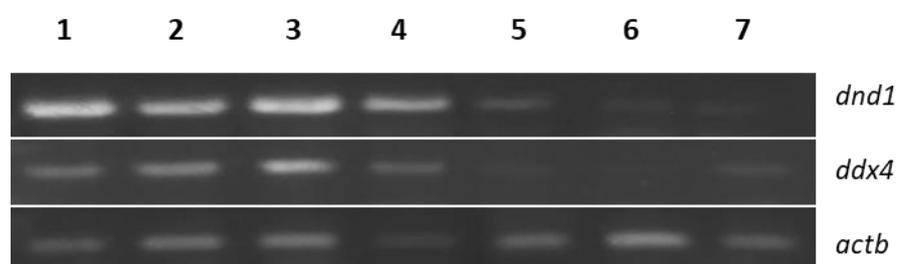
	Total	Não Fertilizados (%)		Clivagem (%)		Blástula (%)		Gástrula (%)		Segmentação (%)		Eclosão (%)		Normal (%)		Anormal (%)	
CCC	217	15,2	± 0,1	84,8	± 8,2	85,5	± 4,8	81,8	± 4,9	79,6	± 5,0	64,2	± 10,5	71,7	± 7,4	28,3	± 7,4
CSC	214	5,7	± 0,0	94,3	± 2,3	79,1	± 3,1	73,3	± 4,7	59,8	± 7,0	31,1	± 1,9	77,6	± 3,2	22,4	± 3,2
GFP	253	10,7	± 0,1	89,3	± 7,2	77,1	± 5,9	66,4	± 5,9	50,3	± 12,3	26,3	± 6,5	85,0	± 3,9	15,0	± 3,9

Não houve diferença significativa entre os grupos controles e grupo experimental em cada estágio de desenvolvimento ( $p < 0,05$ ).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SEMI-QUANTITATIVA E TECIDO ESPECÍFICA DE *ddx4* E *dnd1*

Os primers de *ddx4* e *dnd1* (Tabela 1) foram testados em cDNA das diferentes fases embrionárias e larvais. Durante o desenvolvimento embrionário foi detectada a expressão de *ddx4* em ovo não fertilizados, nas fases de duas e oito células e blástula, sendo observado diminuição na intensidade das bandas, em gástrula com 50% de epibolia, segmentação, mas ainda perceptível na fase de eclosão (Figura 10). A expressão de *dnd1* foi detectada em quase todas as fases avaliadas do desenvolvimento embrionário, com a exceção de gástrula com 50% de epibolia e segmentação (Figura 16). Durante o início do período larval os genes *ddx4* e *dnd1* não foram expressos demonstrando que a expressão neste período não pode ser detectada quando utilizando larvas inteiras, de 1 até 7 dias após a eclosão, para a extração do RNA total. A expressão do endógeno *actb* foi detectada em todas as amostras do desenvolvimento embrionário e larval.

Figura 16- Amplificação de *dnd1*, *ddx4* e *actb* a partir do cDNA de amostras do desenvolvimento embrionário de *P. mangurus*, visualizadas em gel de agarose a 2%.

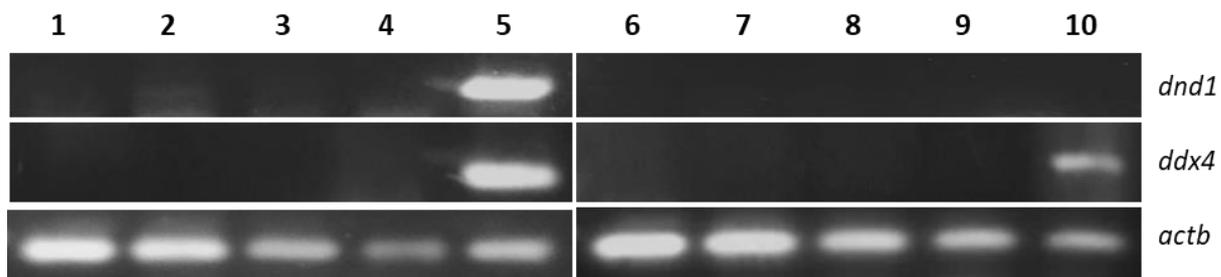


FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – (1) ovo, (2) duas células, (3) oito células, (4) blástula, (5) gástrula com 50% de epibolia, (6) segmentação com 10 somitos, (7) eclosão.

Em tecidos de macho e fêmea adultos, o gene *ddx4* só foi expresso nas gônadas de ambos sexos, enquanto que *dnd1* foi expresso somente em gônada de fêmea adulta (Figura 17). A expressão do gene endógeno *actb*, foi detectada em todas as amostras avaliadas.

Figura 17- Eletroforese da amplificação de *dnd1*, *ddx4* e *actb* em tecidos de fêmea e macho de *P.mangurus* em gel de agarose de 2%.

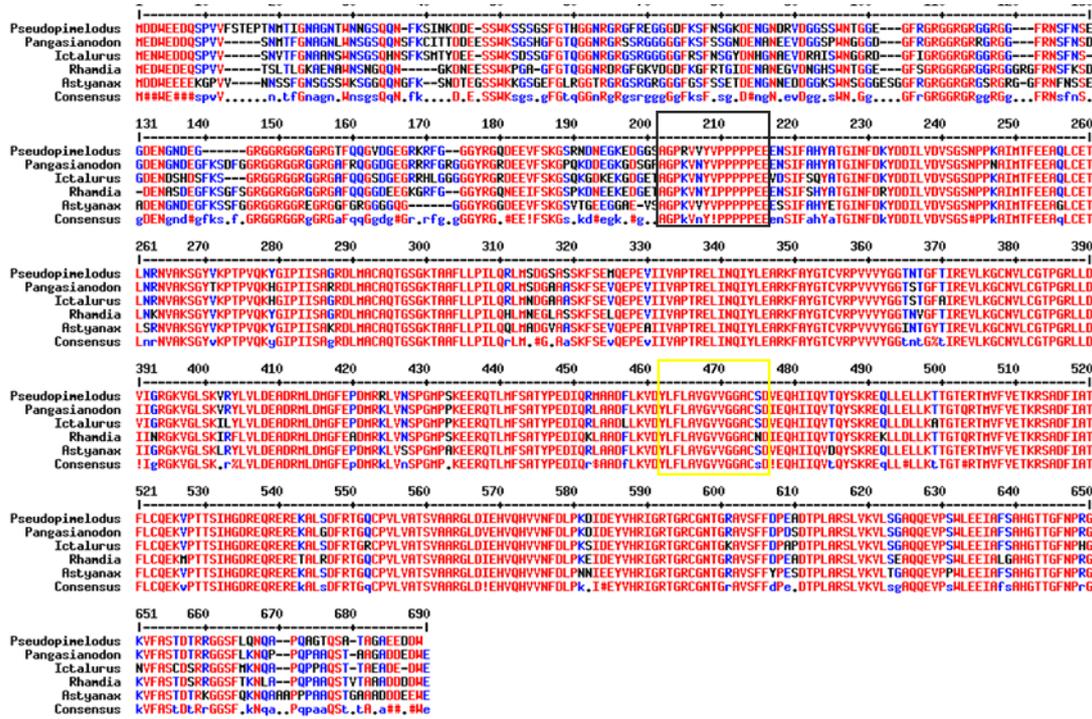


FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda – (1) rim, (2) cérebro, (3) musculo, (4) fígado e (5) gônada de fêmea adulto e (6) rim, (7) cérebro, (8) musculo, (9) fígado e (10) gônada macho adulto.

No alinhamento múltiplo dos aminoácidos de Ddx4 foi verificada alta identidade entre as sequências utilizadas, demonstrando que os domínios DEAD-box helicase e da helicase C-terminal (Figura 18) são bem conservados entre estas espécies, pois estes domínios estão envolvidos em processo celulares, como o desenrolamento e degradação de RNA e splicing. O grau de identidade de *ddx4* de bagre com outras espécies de siluriformes foi de 90,55% com *Ictalurus punctatus* e 85,25% *Rhamdia quelen* e com o characiformes apresentou 80,75% (*Astyanax mexicanus*). A proteína Dnd1 de bagre sapo apresenta menor identidade com as sequencias de outras espécies, comparado a identidade obtida usando Ddx4. A região conservada corresponde ao início do motivo II (Figura 19), conhecido como um dos domínios de ligação de RNA, com a função de reconhecimento e ligação de RNA. As regiões correspondentes aos motivos como os domínios foram determinadas pela plataforma Blastx.

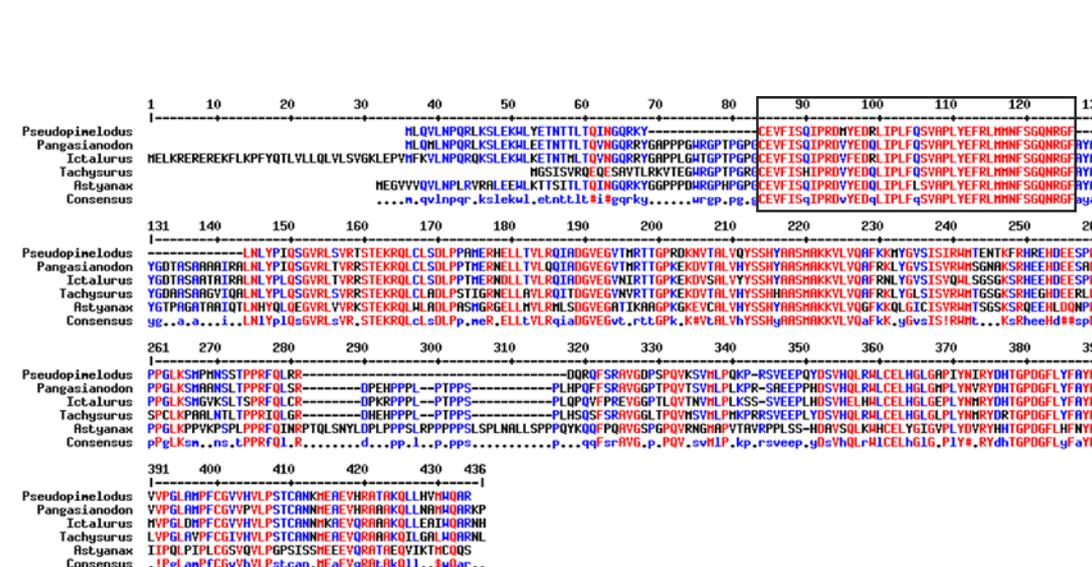
Figura 18- Alinhamento múltiplo dos aminoácidos de Ddx4 de *P. mangurus*, *Pangasianodon hypophthalmus*, *Ictalurus punctatus*, *Rhamdia quelen*, *Astyanax mexicanus*



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda- As molduras indicam o início das regiões conservadas entre as espécies. Moldura preta início do domínio DEAD-box helicase e moldura amarela início da helicase C-terminal. Os IDs GenBank para ddx4 usados para este estudo foram: XP\_026797781.2 de *Pangasianodon hypophthalmus*, XP\_017345568.1 *Ictalurus punctatus*, AHL68988.1 de *Rhamdia quelen*, XP\_022536980.1 de *Astyanax mexicanus*. Alinhados com o programa MultAlin.

Figura 19- Alinhamento múltiplo dos aminoácidos de Dnd1 de *P. mangurus*, *Pangasianodon hypophthalmus*, *Ictalurus punctatus*, *Tachysurus fulvidraco*, *Astyanax mexicanus*



FONTE: ROSERO, J.M., 2023.

Legenda- A moldura indica o início de um dos domínios de ligação de RNA. Os IDs GenBank para dnd1 usados para este estudo foram: XP\_026774658.1 de *Pangasianodon hypophthalmus*, XP\_017340221.1 *Ictalurus punctatus*, XM\_027141187.1 de *Tachysurus fulvidraco*, XP\_007253662.3 de *Astyanax mexicanus*. Alinhados pelo programa MultAlin.

## 6. DISCUSSÃO

A região 3'UTR do mRNA de *ddx4* de bagre sapo proporcionou a regulação da tradução do *gfp* e *dsred* em três espécies neotropicais, e sua expressão foi mantida por mais tempo em PGCs do que em células somáticas graças aos mecanismos de estabilização como é a interação da região 3'UTR com os microRNAs (miR-430), que promovem a degradação dos mRNAs de origem materno (LABBÉ; ROBLES; HERRAEZ, 2017; MIGNONE *et al.*, 2002; SAITO *et al.*, 2011). Indicando assim, que características intrínsecas da migração de PGC em *P. mangurus* poderiam ter impedido a visualização das PGCs durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário desta espécie.

Além disso, outras regiões 3'UTR de *nanos3* (*P. mangurus*), *nanos1* (*Danio rerio*) e *buc* (*P. mangurus*), previamente avaliadas para marcação de PGC de bagre sapo, não foram efetivas na marcação (SHIGUEMOTO *et al.*, 2022), tornando-se necessário a avaliação do mRNA sintético utilizando a região 3'UTR de *ddx4* em espécies com as rotas migratórias das PGCs já descritas, como no lambari (SILVA, 2016) e curimba (COELHO *et al.*, 2021), no intuito de verificar a funcionalidade dos construtos, devido ao fato que *P. mangurus* é uma espécie de reprodução sazonal, de difícil captura e reprodução em cativeiro. No entanto, novos resultados foram obtidos em lambari em relação ao início da visualização de PGCs.

Nas espécies de Characiformes microinjetadas com o mRNA *gfp-Pm-ddx4* 3'UTR foi obtida a identificação das PGCs, demonstrando a funcionalidade e conservação da sequência 3' UTR do mRNA de *ddx4* nas espécies das diferentes ordens taxonômicas avaliadas, sendo que a capacidade das regiões 3'UTR funcionarem em diferentes espécies já é de conhecimento na literatura (SAITO *et al.*, 2006; NAGASAWA *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2019, 2021). Assim as PGCs foram evidenciadas graças a diferenciação das células somáticas que apresentam uma alta taxa de divisão celular em relação as PGCs, diminuindo a concentração das proteínas fluorescentes nestas células subsequentes, e devido a degradação do mRNA sintético microinjetado, uma vez que as células somáticas não possuem as proteínas específicas de ligação a região 3'UTR dos mRNAs específicos de PGCs que inibem degradação destes mRNAs.

O uso da região 3'UTR de *ddx4* para marcação de PGCs em lambari, permitiu a identificação das PGCs na fase gástrula com 70% de epibolia com visualização do

deslocamento espaço-temporal durante a fase de gástrula, somitogênese até a eclosão, enquanto que para a região reguladora 3'UTR de *nanos1* de peixe zebra o início da visualização de PGCs ocorreu na fase de somitos (SILVA, 2016). As PGCs de *A. altiparanae*, observadas a partir da fase de gástrula, é relacionado às funções dos genes para cada espécie (KAWAKAMI *et al.*, 2011; MISHIMA *et al.*, 2006; OMURA; LOTT, 2020). No entanto, as diferenças entre as fases de visualização das PGCs entre as espécies dependem de interações complexas entre proteínas e mRNA ao regular a tradução dos mRNAs específicos de PGCs e a degradação dos mRNAs de origem materno num processo que depende do tamanho do embrião e tempo do desenvolvimento do embrião em cada espécie (MERCER *et al.*, 2021; SAITO *et al.*, 2006; YAMAHA *et al.*, 2010).

A manutenção dos embriões de *P. mangurus* durante o desenvolvimento embrionário foi de difícil execução, resultando em poucos embriões vivos até a somitogênese final ( $12,2 \pm 1,8\%$ ), etapa onde foi obtida a visualização de PGCs, se obtendo um  $29 \pm 0,16\%$  de marcação. Após a micromanipulação, a manutenção da viabilidade dos embriões sem córion de bagre e curimba que são espécies migratórias (MACEDO-SOARES, 2006) foi limitada pelas demandas características dos ovos demersais (CARVALHO *et al.*, 2022). No entanto, o 3% de marcação total, pode ser incrementada ao melhorar a sobrevivência dos embriões microinjetados.

Entre as características próprias dos ovos demersais é a marcada coloração do vitelo (KUNZ, 2004), sendo verde esmeralda em bagre sapo, amarelo-marrom em lambari e cinza em curimba. Nesse contexto, existe uma relação entre o nível de coloração dos ovos dados pelos carotenóides acumulados com a disposição do oxigênio do ambiente, sendo observados ovos mais coloridos em entornos de baixa concentração de oxigênio (KUNZ, 2004).

Assim os carotenóides se tornam suscetíveis à oxidação, em entornos com maiores concentrações de oxigênio (NAKANO; WIEGERTJES, 2020), atuando como pró-oxidante, quando o radical carotenóide reage com oxigênio (O<sub>2</sub>) formando um radical carotenóide peroxila, o que promove o dano oxidativo em biomoléculas como DNA e proteínas (RIBEIRO *et al.*, 2018). Sendo que o vitelo pode estar em contato direto com o meio de manutenção após a retirada do corion além das lacerações produzidas pela microinjeção.

A baixa sobrevivência também pode estar ligada ao volume da solução do mRNA injetado, pois como foi testado em *A. altiparanae* e *P. lineatus* espécies, baixos

volumes de mRNA (~10 nL na concentração de 100 ng/ $\mu$ L) não foram eficientes para obtenção de fluorescência pela proteína GFP/DsRed nas PGCs (dados não publicados). Considerando-se que cerca de 20 nL de mRNA sintético (100 ng/ $\mu$ L) proveniente dos vetores construídos, utilizando as regiões codificadoras *gfp* e *dsred* promoveram a correta marcação das PGCs durante o período de segmentação nas espécies controle, foi o volume com que se obteve a efetiva marcação *in vivo* de PGCs de *P. mangurus*. Diante dessa possível problemática, uma saída para tal problema seria aumentar a concentração de mRNA sintético a ser injetado, diminuindo-se o volume injetado em cada embrião.

Utilizando o gene repórter DsRed, as PGCs de *P. mangurus* foram visualizadas no estágio de segmentação com 28 somitos, na região da crista gonadal. O estágio no qual foram visualizadas as PGCs poderia estar relacionado à espécie como também ao tipo de marcador usado. A transcrição do gene *ddx4* em mamíferos (camundongo) e anfíbios urodeles (axolotes) inicia logo após as PGCs colonizarem a crista genital com a ativação transcricional (PORRAS-GÓMEZ; VILLAGRÁN-SANTACRUZ; MORENO-MENDOZA, 2021). Em *Pangasianodon hypophthalmus* (siluriforme), foi observada a expressão de *ddx4* em PGCs em larvas 2 dpf- 10 dpf, indicando o início da migração das PGCs até a crista gonadal (DUANGKAEW *et al.*, 2019). No entanto, em lambari e curimba, onde na fase de segmentação é observada marcação das PGCs, indica-se que a tradução do gene repórter está sendo realizada nesta fase e a tradução se dá pela regulação 3'UTR de *ddx4*. Portanto, as variações na tradução de *ddx4* entre outros genes de origem materno diferem entre as espécies (MERCER *et al.*, 2021).

No entanto, as expressões de *dnd1* e *ddx4* detectadas durante o desenvolvimento embrionário de *P. mangurus*, sugerem que mantiveram uma expressão semelhantes ao descrito na literatura (SHIGUEMOTO *et al.*, 2022). Embora a expressão destes genes tenha sido evidenciada apenas por PCR convencional, não sendo confirmado o nível de expressão gênica ou dos seus produtos gênicos,

Durante o desenvolvimento embrionário de bagre sapo os genes *ddx4* e *dnd1* foram nitidamente expressos nos estágios de ovo não fertilizado, duas e oito células e blástula, com a progressiva diminuição da expressão para ambos genes nas seguintes fases de gástrula, segmentação e eclosão. A expressão de *dnd1* foi detectada em todos os estágios do desenvolvimento embrionário, similar aos resultados de outros teleostes (COOK *et al.*, 2011; YOUNGREN *et al.*, 2005),

ressaltando as funções do gene na regulação da tradução e expressão de fatores críticos nas células-tronco embrionárias (LI *et al.*, 2018).

No caso de *ddx4*, a expressão foi quase que indetectável nos estágios de gástrula e segmentação com 10 somitos, apresentado uma banda mais definida durante a eclosão, contrário aos resultados achados em salmão, onde o *ddx4* foi detectado nos estágios de duas células até a segmentação com 10 somitos (NAGASAWA *et al.*, 2013). Os níveis de expressão de *ddx4* podem variar entre as espécies, devido ao papel divergente do gene durante o transcurso da especificação das PGCs e mecanismos adotados por cada espécie (SKVORTSOVA *et al.*, 2019; TAYLOR *et al.*, 2017).

Na expressão tecido específica, *ddx4* foi verificado apenas em gônadas de macho e fêmea, não sendo detectada em outros tecidos. Estes resultados indicam que as funções do gene são sustentadas ao longo do desenvolvimento das células germinativas, com a posterior expressão em espermátides pós-meióticas e oócitos (GASSEI *et al.*, 2017). Por outro lado, *dnd1* não foi expresso na gônada de macho adulto o que pode evidenciar uma divergência numa das importantes funções de *dnd1*, na interação específica com o complexo de edição de apolipoproteína B3 (APOBEC3), que desempenha um papel na manutenção, viabilidade das células germinativas e na prevenção do desenvolvimento de tumores de células germinativas (BHATTACHARYA *et al.*, 2008; RUTHIG *et al.*, 2021).

No alinhamento dos aminoácidos, obtidos a partir dos transcritos de mRNA dos genes avaliados de bagre sapo, foi verificado a presença de regiões conservadas nas sequências das proteínas Dnd1 e Ddx4 entre diferentes espécies de teleostes, indicando que as funções características destes genes são mantidas entre espécies distantes.

A identificação tardia de PGCs na fase de desenvolvimento, após 20 somitos, dificulta o seu uso no transplante ao apresentar migração ectópica nos receptores (KAWAKAMI *et al.*, 2011), pois as PGCs são mais propensas a migrar para a crista gonadal do receptor quando são obtidas precocemente (10-15 somitos), levando em consideração que os transplantes de PGCs são realizados nos estágios de blástula (KAWAKAMI *et al.*, 2011; SAITO *et al.*, 2014b), ou em larvas receptoras (TAKEUCHI; YOSHIZAKI; TAKEUCHI, 2003; YOSHIZAKI; LEE, 2018). As PGCs visualizadas durante a somitogênese e transplantadas em blástula precisam migrar em direção à região de formação das futuras gônadas, antes de estarem associadas às células

somáticas gonadais (INOUE *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2018). Como em bagre sapo a identificação das PGCs foi obtida na fase final da somitogênese, as PGCs poderiam apresentar a capacidade de migração diminuída, apesar que os transplantes destas PGCs identificadas ainda serão avaliados.

As PGCs são células essenciais para a propagação mediada, tornando-se indispensável o uso de novas técnicas para utilização das PGCs em transplante quando são identificadas em estágios avançados do desenvolvimento embrionário. Dentre outras técnicas, a reprogramação celular pode ser uma alternativa atrativa. Um estudo recente em ratos, demonstrou que a partir da indução das células-tronco embrionárias (ESC) em PGCLCs (primordial germ cell-like cells) obteve-se a produção de espermatozoides, após o transplante no testículo estéril, estabelecendo os meios de cultivo celular que propiciaram os diferentes mecanismos genéticos e epigenéticos para a indução especificação e, posterior diferenciação das células transplantadas em gametas nessa espécie (OIKAWA *et al.*, 2022). Em primatas, PGCLCs obtidas a partir da indução de células-tronco embrionárias atingiram a maturação programada, mas ainda sem a produção de gametas (SOSA *et al.*, 2018).

A reprogramação de ESC para geração de PGCs em bagre sapo pode ser uma alternativa promissora, tendo em conta que os transplantes de espermatogônias foram bem-sucedidos quando foram transplantados nas cavidades peritoneais em larvas receptoras estéreis (YOSHIZAKI; LEE, 2018) e larvas triploides estéreis (ZHOU *et al.*, 2021) com a produção de espermatozoides viáveis do doador. No transplante de espermatogônia-tronco de *Brycon orbignyanus* (espécie neotropical), em adultos híbridos triploides de *A. altiparane* livres de células germinativas nas gônadas apresentaram a colonização das células germinativas, podendo vir a produzir sêmen da espécie doadoras (SUAREZ *et al.*, 2022). Assim PGCLCs obtidas a partir de ESC de bagre sapo podem ser uma alternativa para obtenção de quimera germinativa, o que requer estudos aprofundados acerca desta área.

## 7. CONCLUSÕES

Foi possível a identificação *in vivo* das PGCs durante o desenvolvimento embrionário de *Pseudopimelodus mangurus*, mediante a expressão do gene repórter *dsred* com regulação da tradução pela região 3'UTR do mRNA de *ddx4* de *P. mangurus*. Além disso, foi verificada a funcionalidade desta região em espécies distantes taxonomicamente, evidenciando novas informações acerca da rota migratória de *A. altiparanae*. Porém, compreender as interações dos mRNAs com as diferentes proteínas e regiões 3'UTR as quais tem um efeito regulador na expressão e tradução dos mRNAs durante o desenvolvimento embrionário normal continua sendo crucial nas espécies neotropicais para a obtenção das quimeras germinativas, dada divergência no início da expressão dos genes nas PGCs durante as fases ontogênicas.

O uso da região 3'UTR de *ddx4* de uma espécie neotropical é inédito permitindo a visualização de PGCs em bagre sapo durante a segmentação final, sendo os resultados reforçados pelas avaliações de expressão gênica feitas pelo PCR convencional, sendo que as expressões de *ddx4* foram obtidas a partir de ovo até a eclosão contribuindo assim com a investigação do quimerismo interespecífico da linhagem germinativa, utilizando o método de transplante de PGCs, de uma espécie ameaçada ou de alto valor comercial como doador, para um hospedeiro estéril. Esses resultados fornecem informações na tecnologia de quimerismo da linhagem germinativa que é imprescindível para sua aplicação na conservação das espécies endêmicas ou ameaçadas, seja através de posteriores repovoamentos ou geração de criobancos.

Os avanços obtidos para o bagre sapo são fundamentais para sua conservação e os procedimentos desenvolvidos podem ser expandidos para outras espécies de siluriformes. O transplante de PGCs-Dsred positivas em receptores estéreis na fase de blástula traria informações quanto a capacidade destas células migrarem para a região da crista gonadal nos embriões receptores, e conseqüentemente, gerarem quimeras germinativas.

## 8. PERSPECTIVAS

A partir dos dados obtidos neste trabalho, poderá ser realizado o transplante de PGC de bagre sapo em blástula de receptores estéreis (mandi triploide, híbrido de mandi e bagre sapo ou lambari híbrido triploide) para avaliação da capacidade de migração destas PGCs e consequente geração de quimeras germinativas.

O lambari tem se tornado uma espécie modelo emergente de peixes neotropicais devido à facilidade na reprodução, cultivo e tamanho, além da facilidade na micromanipulação. No entanto a síntese do mRNA sintéticos a partir de genes oriundos do transcriptoma do lambari poderiam ser usados para futuros trabalhos de identificação de PGCs em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, tanto do lambari como para outras espécies neotropicais.

## 9. REFERENCIAS

- ABRAMS, E. W.; MULLINS, M. C. Early zebrafish development: It's in the maternal genes. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 19, n. 4, p. 396–403, 2009.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 646–652, 2005.
- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 27–53, 2020.
- ARANTES, C. C.; FITZGERALD, D. B.; HOEINGHAUS, D. J.; WINEMILLER, K. O. Impacts of hydroelectric dams on fishes and fisheries in tropical rivers through the lens of functional traits. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 37, p. 28–40, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cosust.2019.04.009>>.
- ARASHIRO, D. R.; YASUI, G. S.; CALADO, L. L.; DO NASCIMENTO, N. F.; DOS SANTOS, M. P.; DO SANTOS, S. C. A.; LEVY-PEREIRA, N.; MONZANI, P. S.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SENHORINI, J. A. Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation. **Zygote**, v. 26, n. 2, p. 135–148, 2018.
- ARASHIRO, D. R.; YASUI, G. S.; CALADO, L. L.; FERREIRA, N.; CARLOS, S.; SHIGUEMOTO, G. F.; MONZANI, P. S.; SENHORINI, J. A. Capturing , induced spawning , and first feeding of wild-caught *Pseudopimelodus mangurus* , an endangered catfish species. v. 48, n. 3, p. 440–445, 2020.
- AZEVEDO-SANTOS, V. M.; RODRIGUES-FILHO, J. L.; FEARNSIDE, P. M.; LOVEJOY, T. E.; BRITO, M. F. G. Conservation of Brazilian freshwater biodiversity: Thinking about the next 10 years and beyond. **Biodiversity and Conservation**, v. 30, n. 1, p. 235–241, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10531-020-02076-5>>.
- BALOCH, A. R.; FRANĚK, R.; SAITO, T.; PŠENIČKA, M. Dead-end (dnd) protein in fish—a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2019.
- BHATTACHARYA, C.; AGGARWAL, S.; KUMAR, M.; ALI, A.; MATIN, A. Mouse apolipoprotein B editing complex 3 (APOBEC3) is expressed in germ cells and interacts with dead-end (DND1). **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. 1–10, 2008.
- BLASER, H.; EISENBEISS, S.; NEUMANN, M.; REICHMAN-FRIED, M.; THISSE, B.; THISSE, C.; RAZ, E. Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 17, p. 4027–4038, 2005.
- CARVALHO, G. B.; COELHO, G. C. Z.; ALVES, A. C.; SILVA, A. P. D. S.; SÉRGIO MONZANI, P.; SENHORINI, J. A.; CASTRO VIANNA, N.; YASUI, G. S. Embryo manipulation in neotropical characiform fish: incubation system, anaesthetic, and PGC transplantation in *Prochilodus lineatus* . **Zygote**, p. 1–8, 2022.
- CIRUNA, B.; WEIDINGER, G.; KNAUT, H.; THISSE, B.; THISSE, C.; RAZ, E.; SCHIER, A. F. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 23, p. 14919–14924, 2002.
- COELHO, G. C. Z.; ARASHIRO, D. R.; DISSELLI, T.; PEREIRA-SANTOS, M.; MIRALÓPEZ, T. M.; MONZANI, P. S.; SENHORINI, J. A.; FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S. Developmental stages, incubation temperature, and in vivo traceability of primordial

- germ cell in an important aquaculture species *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 535, n. May 2020, 2021.
- COELHO, G. C. Z.; YO, I. S.; MIRA-LÓPEZ, T. M.; MONZANI, P. S.; ARASHIRO, D. R.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S. Preparation of a fish embryo for micromanipulation: staging of development, removal of the chorion and traceability of PGCs in *Prochilodus lineatus*. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 63, n. 1–2, p. 57–65, 2019.
- COOK, M. S.; MUNGER, S. C.; NADEAU, J. H.; CAPE, B. Regulation of male germ cell cycle arrest and differentiation by DND1 is modulated by genetic background. **Development**, v. 138, n. 1, p. 23–32, 2011.
- D'ORAZIO, F. M.; BALWIERZ, P. J.; GONZÁLEZ, A. J.; GUO, Y.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, B.; WHEATLEY, L.; JASIULEWICZ, A.; HADZHIEV, Y.; VAQUERIZAS, J. M.; CAIRNS, B.; LENHARD, B.; MÜLLER, F. Germ cell differentiation requires Tdrd7-dependent chromatin and transcriptome reprogramming marked by germ plasm relocalization. **Developmental Cell**, v. 56, n. 5, p. 641–656.e5, 2021.
- DUANGKAEW, R.; JANGPRAI, A.; ICHIDA, K.; YOSHIZAKI, G.; BOONANUNTANASARN, S. Characterization and expression of a vasa homolog in the gonads and primordial germ cells of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Theriogenology**, v. 131, p. 61–71, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.022>>.
- FERNÁNDEZ, J. A.; BUBNER, E. J.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; WANG, T.; CUMMINS, S. F.; ELIZUR, A. Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. **General and Comparative Endocrinology**, v. 213, p. 16–23, 2015.
- FERRARIS, C. J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types**. [s.l.: s.n.]1–628 p.
- FRICKE, R., ESCHMEYER, W., & FONG, J. D. (15 de fevereiro de 2022). California Academy of Sciences. Acesso em 15 de novembro de 2022, disponível em Genera/Species by Family/SUubfamily in Eschmeyer's Catalog of Fishes: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>
- GASSEI, K.; SHENG, Y.; FAYOMI, A.; MITAL, P.; SUKHWANI, M.; LIN, C. C.; PETERS, K. A.; ALTHOUSE, A.; VALLI, H.; ORWIG, K. E. DDX4-EGFP transgenic rat model for the study of germline development and spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 3, p. 707–719, 2017.
- GE, S.; DAN, C.; XIONG, Y.; GONG, G.; MEI, J.; GUO, W.; LI, X. Identifying difference in primordial germ cells between XX female and XY male yellow cat fish embryos. v. 761, n. August, 2020.
- GOTO, R.; SAITO, T. A state-of-the-art review of surrogate propagation in fish. **Theriogenology**, v. 133, p. 216–227, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.032>>.
- GÜRALP, H.; POCHERNIAIEVA, K.; BLECHA, M.; POLICAR, T.; PŠENIČKA, M.; SAITO, T. Migration of primordial germ cells during late embryogenesis of pikeperch *Sander lucioperca* relative to blastomere transplantation. **Czech Journal of Animal Science**, v. 62, n. 3, p. 121–129, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.17221/40/2016-CJAS>>.
- HANSEN, C. L.; PELEGRI, F. Primordial Germ Cell Specification in Vertebrate Embryos: Phylogenetic Distribution and Conserved Molecular Features of Preformation and Induction. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. September, p. 1–22, 2021.

- HERPIN, A.; ROHR, S.; RIEDEL, D.; KLUEVER, N.; RAZ, E.; SCHARTL, M. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 1–10, 2007.
- HYTTEL, P.; SINOWATS, F.; VEJLDSTED, M. **Essentials in the domestic animals embryology**. Elsevier. p.262. 2010
- INOUE, D.; FUJIMOTO, T.; KAWAKAMI, Y.; YASUI, G. S.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Vitrification of primordial germ cells using whole embryos for gene-banking in loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 6, p. 919–924, 2012.
- ICMBio/MMA. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção** Primeira ed, v 1, Brasília, DF: ISBN:978-85-61842-79-6. 2018.
- KAWAKAMI, Y.; SAITO, T.; FUJIMOTO, T.; GOTO-KAZETO, R.; TAKAHASHI, E.; ADACHI, S.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Visualization and motility of primordial germ cells using green fluorescent protein fused to 3'UTR of common carp nanos-related gene. **Aquaculture**, v. 317, n. 1–4, p. 245–250, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.019>>.
- KEDDE, M.; STRASSER, M. J.; BOLDAJIPOUR, B.; VRIELINK, J. A. F. O.; SLANCHEV, K.; LE SAGE, C.; NAGEL, R.; VOORHOEVE, P. M.; VAN DUIJSE, J.; ØROM, U. A.; LUND, A. H. H.; PERRAKIS, A.; RAZ, E.; AGAMI, R. RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. **Cell**, v. 131, n. 7, p. 1273–1286, 2007.
- KNAUT, H.; STEINBEISSER, H.; SCHWARZ, H.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; GENETIK, A. I. I. I. Uma região evolucionária conservada na vasa 3 UTR visa a tradução de RNA para as células germinativas no. v. 12, n. 02, p. 454–466, 2002.
- LABBÉ, C.; ROBLES, V.; HERRAEZ, M. P. Epigenetics in fish gametes and early embryo. **Aquaculture**, v. 472, p. 93–106, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>>.
- LI, M.; ZHU, F.; LI, Z.; HONG, N.; HONG, Y. Dazl is a critical player for primordial germ cell formation in medaka. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep28317>>.
- LI, Q.; LI, Y.; YANG, S.; HUANG, S.; YAN, M.; DING, Y.; TANG, W.; LOU, X.; YIN, Q.; SUN, Z.; LU, L.; SHI, H.; WANG, H.; CHEN, Y.; LI, J. CRISPR–Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 11, p. 1315–1325, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0202-4>>.
- LINHARTOVA, Z.; SAITO, T.; PSENICKA, M. Embryogenesis, visualization and migration of primordial germ cells in tench (*Tinca tinca*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, n. S1, p. 29–39, 2014.
- LUBZENS, E.; BOBE, J.; YOUNG, G.; SULLIVAN, C. v. Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo and its contributions to fertility and early development. **Aquaculture**, v. 472, p. 107–143, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.029>>.
- MACEDO-SOARES, M. L. C. P. de. Ovos e larvas de peixes. p. 164–201, 2006.
- MERCER, M.; JANG, S.; NI, C.; BUSZCZAK, M. The Dynamic Regulation of mRNA Translation and Ribosome Biogenesis During Germ Cell Development and Reproductive Aging. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. November, p. 1–23, 2021.
- MIGNONE, F.; GISSI, C.; LIUNI, S.; PESOLE, G. Untranslated regions of mRNAs. **Genome Biology**, v. 3, n. 3, 2002.

- MISHIMA, Y.; GIRALDEZ, A. J.; TAKEDA, Y.; FUJIWARA, T.; SAKAMOTO, H.; SCHIER, A. F.; INOUE, K. Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by Zebrafish miR-430. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2135–2142, 2006.
- MONAGHAN, K. A.; AGOSTINHO, C. S.; PELICICE, F. M.; SOARES, A. M. V. M. The impact of a hydroelectric dam on Neotropical fish communities: A spatio-temporal analysis of the Trophic Upsurge Hypothesis. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 29, n. 2, p. 384–397, 2020.
- NAGASAWA, K.; FERNANDES, J. M. O.; YOSHIZAKI, G.; MIWA, M.; BABIAK, I. Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: Characterization of *Vasa*, *Dead End*, and *Lymphocyte antigen 75* genes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 2, p. 118–131, 2013.
- NAKANO, T.; WIEGERTJES, G. Properties of Carotenoids in Fish Fitness: A Review. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 1–17, 2020.
- NARAIN, R.; IEGOROVA, V.; ABAFFY, P.; FRANEK, R.; SOUKUP, V.; PSENICKA, M.; SINDELKA, R. Evolutionary conservation of maternal RNA localization in fishes and amphibians revealed by TOMO-Seq. **Developmental Biology**, v. 489, n. March, p. 146–160, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.06.013>>.
- NORTHRUP, E.; EISENBLÄTTER, R.; GLAGE, S.; RUDOLPH, C.; DORSCH, M.; SCHLEGELBERGER, B.; HEDRICH, H. J.; ZSCHEMISCH, N. H. Loss of *Dnd1* facilitates the cultivation of genital ridge-derived rat embryonic germ cells. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 13, p. 1885–1894, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.04.013>>.
- OIKAWA, M.; KOBAYASHI, H.; SANBO, M.; MIZUNO, N.; IWATSUKI, K.; TAKASHIMA, T.; YAMAUCHI, K.; YOSHIDA, F.; YAMAMOTO, T.; SHINOHARA, T.; NAKAUCHI, H.; KURIMOTO, K.; HIRABAYASHI, M.; KOBAYASHI, T. Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats. **Science**, v. 376, n. 6589, p. 176–179, 2022.
- OMURA, C. S.; LOTT, S. E. The conserved regulatory basis of mRNA contributions to the early *Drosophila* embryo differs between the maternal and zygotic genomes. **PLoS Genetics**, v. 16, n. 3, p. 1–30, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1008645>>.
- OMURA, G.; COSTA, D. A. **Aprimoramento do protocolo de DNA metabarcoding para aplicação na identificação de áreas prioritárias à conservação da ictiofauna do rio mogi-guaçu**. p. 98. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Genética). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, (UNESP). Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu, São Paulo. 2021.
- OSMAN, I.; PEK, J. W. Maternally inherited intron coordinates primordial germ cell homeostasis during *Drosophila* embryogenesis. **Cell Death and Differentiation**, v. 28, n. 4, p. 1208–1221, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41418-020-00642-6>>.
- PELICICE, F. M.; AZEVEDO-SANTOS, V. M.; VITULE, J. R. S.; ORSI, M. L.; LIMA JUNIOR, D. P.; MAGALHÃES, A. L. B.; POMPEU, P. S.; PETRERE, M.; AGOSTINHO, A. A. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 6, p. 1119–1133, 2017.
- PESSOA, Giselle. **Isolamento e criopreservação de espermatogônia tronco de *Pseudopimelodus mangurus* e análises preliminares de ciclosporina a como inibidor em receptores de células germinativas**. 2023, 95 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Botucatu, São Paulo. 2023.

- PORRAS-GÓMEZ, T. J.; VILLAGRÁN-SANTACRUZ, M.; MORENO-MENDOZA, N. Biology of primordial germ cells in vertebrates with emphasis in urodeles amphibians. **Molecular Reproduction and Development**, v. 88, n. 12, p. 773–792, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mrd.23533>>.
- RAJENDIRAN, P.; JAAFAR, F.; KAR, S.; SUDHAKUMARI, C.; SENTHILKUMARAN, B.; PARHAR, I. S. Sex determination and differentiation in teleost: Roles of genetics, environment, and brain. **Biology**, v. 10, n. 10, 2021.
- RAZ, E. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development Germ-cell development in vertebrates and invertebrates. **Genome Biology**, v. 1, n. 36, p. 1017–1, 2000. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2000/1/3/reviews/1017.1%5Cnhttp://genomebiology.com/2000/1/3/reviews/1017>>.
- REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.
- RESTREPO-GÓMEZ, A. M.; RANGEL-MEDRANO, J. D.; MÁRQUEZ, E. J.; ORTEGA-LARA, A. Two new species of *Pseudopimelodus* Bleeker, 1858 (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the Magdalena Basin, Colombia. **PeerJ**, v. 8, 2020.
- RIESCO, M. F.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; CHEREGUINI, O.; ROBLES, V. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 122- 130.e2, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.024>>.
- RIVERS, N.; DALY, B.; UMA, C. P. T. Novos rumos em técnicas de reprodução assistida para conservação de peixes. 2020.
- ROBLES, V.; RIESCO, M. F.; PSENICKA, M.; SAITO, T.; VALCARCE, D. G.; CABRITA, E.; HERRÁEZ, P. Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. **Aquaculture**, v. 472, p. 4–20, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.004>>.
- RUTHIG, V. A.; YOKONISHI, T.; FRIEDERSDORF, M. B.; BATCHVAROVA, S.; HARDY, J.; GARNES, J. A.; KEENE, J. D.; CAPEL, B. A transgenic DND1GFPfusion allele reports in vivo expression and RNA-binding targets in undifferentiated mouse germ cells. **Biology of Reproduction**, v. 104, n. 4, p. 861–874, 2021.
- SAITO, T.; FUJIMOTO, T.; MAEGAWA, S.; INOUE, K.; TANAKA, M.; ARAI, K.; YAMAHA, E. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. **International Journal of Developmental Biology**, v. 50, n. 8, p. 691–700, 2006.
- SAITO, T.; GOTO-KAZETO, R.; KAWAKAMI, Y.; NOMURA, K.; TANAKA, H.; ADACHI, S.; ARAI, K.; YAMAHA, E. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1–8, 2011.
- SAITO, T.; PSĚNIČKA, M.; GOTO, R.; ADACHI, S.; INOUE, K.; ARAI, K.; YAMAHA, E. The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014a.
- SAITO, T.; PSĚNIČKA, M.; GOTO, R.; ADACHI, S.; INOUE, K.; ARAI, K.; YAMAHA, E. The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014b.
- SÃO PAULO. Decreto nº 60133, de 7 de fevereiro de 2014. Diário Oficial do Estado de São Paulo, Seção 1, p. 124 (27), 8 de fevereiro de 2014.
- SHIBATTA, O. A.; JARDULI, L. R.; ABRAHÃO, V. P.; SOUZA-SHIBATTA, L. Phylogeny of the Neotropical Pacman catfish genus *Lophiosilurus* (Siluriformes: Pseudopimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 4, p. 1–28, 2021.

- SHIGUEMOTO, G. F. Ferramentas para a conservação do bagre sapo *pseudopimelodus mangurus*: domesticação e aplicação de biotecnologias. 2020.
- SHIGUEMOTO, G. F.; ARASHIRO, D. R.; LEVY-PEREIRA, N.; SANTOS, S. C. A.; SENHORINI, J. A.; MONZANI, P. S.; YASUI, G. S. Domestication strategies for the endangered catfish species *Pseudopimelodus mangurus* Valenciennes, 1835 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, p. 301–308, 2021.
- SHIGUEMOTO, G.; GEOVANNA, S.; ZACHEO, C.; LUCIA, C.; LÓPEZ, S.; PESSANHA, G.; SILVIO, P.; ALVES, C.; AUGUSTO, J.; SÉRGIO, P.; GEORGE, M.; YASUI, S. Primordial germ cell identification and traceability during the initial development of the Siluriformes fish *Pseudopimelodus mangurus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, n. 0123456789, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10695-022-01106-z>>.
- SIQUEIRA-SILVA, D. H. de; SAITO, T.; SANTOS-SILVA, A. P.; COSTA, S.; PSENICKA, M.; YASUI, G. S. Biotechnology applied to fish reproduction : tools for conservation. n. April, 2018.
- SILVA, Regiane Cristina da. **Rastreabilidade de células germinativas primordiais (CGPs) e micromanipulação em duas espécies de peixes teleósteos**. 2016, xiv, 138 p. Dissertação (Doutorado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista (UNESP). Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Jaboticabal, São Paulo. 2016.
- SKVORTSOVA, K.; TARBASHEVICH, K.; STEHLING, M.; LISTER, R.; IRIMIA, M.; RAZ, E.; BOGDANOVIC, O. Retention of paternal DNA methylome in the developing zebrafish germline. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10895-6>>.
- SONG, P.; SUN, B.; ZHU, Y.; ZHONG, Y.; GUO, J.; GUI, L.; LI, M. Bucky ball induces primordial germ cell increase in medaka. **Gene**, v. 768, n. October 2020, p. 145317, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145317>>.
- SOSA, E.; CHEN, D.; ROJAS, E. J.; HENNEBOLD, J. D.; PETERS, K. A.; WU, Z.; LAM, T. N.; MITCHELL, J. M.; SUKHWANI, M.; TAILOR, R. C.; MEISTRICH, M. L.; ORWIG, K. E.; SHETTY, G.; CLARK, A. T. Differentiation of primate primordial germ cell-like cells following transplantation into the adult gonadal niche. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07740-7>>.
- SUAREZ, Lucia. **Transplante interespecífico de espermatogônia-tronco de piracanjuba *Brycon orbignyanus***. 2022, 133 p. Dissertação (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Botucatu, São Paulo. 2022.
- SUN, Z. H.; ZHOU, L.; LI, Z.; LIU, X. C.; LI, S. S.; WANG, Y.; GUI, J. F. Sexual dimorphic expression of *dnd* in germ cells during sex reversal and its requirement for primordial germ cell survival in protogynous hermaphroditic grouper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 208–209, p. 47–57, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.04.003>>.
- TADROS, W.; LIPSHITZ, H. D. The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts. **Development**, v. 136, n. 18, p. 3033–3042, 2009.
- TAKEDA, Y.; MISHIMA, Y.; FUJIWARA, T.; SAKAMOTO, H.; INOUE, K. DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

- TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1142–1149, 2003.
- TAYLOR, L.; CARLSON, D. F.; NANDI, S.; SHERMAN, A.; FAHRENKRUG, S. C.; MCGREW, M. J. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. **Development (Cambridge)**, v. 144, n. 5, p. 928–934, 2017.
- VERA-ALCARAZ, H. S.; RIOS, G.; EMHART VULETICH, J. D. Confirmation of the occurrence for seven fish species in Paraguay. **Ichthyological Contributions of PecesCriollos**, v. 49, p. 1–9, 2017. Disponível em: <www.pecesciollos.de>.
- WONG, T. T.; ZOHAR, Y. Production of reproductively sterile fish: A mini-review of germ cell elimination technologies. **General and Comparative Endocrinology**, v. 221, p. 3–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.012>>.
- WU, X. L.; TANG, Z. K.; LI, W.; CHU, Z. J.; HONG, X. Y.; ZHU, X. P.; XU, H. Y. Identifying the germ cells during embryogenesis and gametogenesis by germ-line gene vasa in an anadromous fish, American shad *Alosa sapidissima*. **Journal of Fish Biology**, v. 92, n. 5, p. 1422–1434, 2018.
- XIAO, Q.; SUN, Y.; LIANG, X.; ZHANG, L.; ONXAYVIENG, K.; LI, Z.; LI, D. Visualizing primordial germ cell migration in embryos of rice field eel (*Monopterus albus*) using fluorescent protein tagged 3' untranslated regions of nanos3, dead end and vasa. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 235, n. June, p. 62–69, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.06.002>>.
- YAMAHA, E.; GOTO-KAZETO, R.; SAITO, T.; KAWAKAMI, Y.; FUJIMOTO, T.; ADACHI, S.; ARAI, K. Primordial germ cell in teleost fish with special references to its specification and migration. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 816–822, 2010.
- YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: An approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 3, p. 464–470, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1751731114002511>>.
- YE, D.; ZHU, L.; ZHANG, Q.; XIONG, F.; WANG, H.; WANG, X.; HE, M.; ZHU, Z.; SUN, Y. Abundance of Early Embryonic Primordial Germ Cells Promotes Zebrafish Female Differentiation as Revealed by Lifetime Labeling of Germline. **Marine Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 217–228, 2019.
- YÖN, N. D.; AKBULUT, C. Identification of primordial germ cells: Cytological, histological and immunohistochemical aspects. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 222–228, 2015.
- YOSHIZAKI, G.; LEE, S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. **Stem Cell Research**, v. 29, p. 103–110, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.015>>.
- YOUNGREN, K. K.; COVENEY, D.; PENG, X.; BHATTACHARYA, C.; SCHMIDT, L. S.; NICKERSON, M. L.; LAMB, B. T.; DENG, J. M.; BEHRINGER, R. R.; CAPEL, B.; RUBIN, E. M.; NADEAU, J. H.; MATIN, A. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. **Nature**, v. 435, n. 7040, p. 360–364, 2005.
- ZHOU, L.; WANG, X.; DU, S.; WANG, Y.; ZHAO, H.; DU, T.; YU, J.; WU, L.; SONG, Z.; LIU, Q.; LI, J. Germline Specific Expression of a vasa Homologue Gene in the Viviparous Fish Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*) and Functional Analysis of the

vasa 3' Untranslated Region. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. October, p. 1–15, 2020.

ZHOU, L.; WANG, X.; LIU, Q.; YANG, J.; XU, S.; WU, Z.; WANG, Y.; YOU, F.; SONG, Z.; LI, J. Successful spermatogonial stem cells transplantation within pleuronectiformes: First breakthrough at inter-family level in marine fish. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 15, p. 4426–4441, 2021.

ZHU, T.; GUI, L.; ZHU, Y.; LI, Y.; LI, M. Dnd is required for primordial germ cell specification in *Oryzias celebensis*. **Gene**, v. 679, n. July, p. 36–43, 2018.

APÊNDICE A – Condições para amplificação das regiões 3'UTR e regiões codificadoras de *ddx4* e *dnd1*. A tabela 1 descreve os reagentes e as concentrações utilizadas para a realização da PCR. A tabela 2 descreve os passos, condições de temperatura e tempo para a amplificação das regiões 3'UTR de *ddx4* e *dnd1* pela PCR. A tabela 3 descreve os passos, condições de temperatura e tempo para a amplificação de *ddx4*, *dnd1* e  $\beta$ -*actina* pela PCR. Foram usados 35 ciclos das etapas desnaturação, anelamento e extensão da PCR. Foram utilizados 1 e 2  $\mu$ l de cDNA para nas reações de 30  $\mu$ l e 50  $\mu$ l de volume final de reação, respectivamente.

**Tabela 1**

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final
Solução tampão	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM
cDNA	~1200 ng/ $\mu$ l	40 ng/ $\mu$ l
Taq DNA polimerase	5 U/ $\mu$ l	0,05 U/ $\mu$ l
Mix primers F-R	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M
dNTP	10 mM	0,2 mM
Água DEPC	-	-

**Tabela 2**

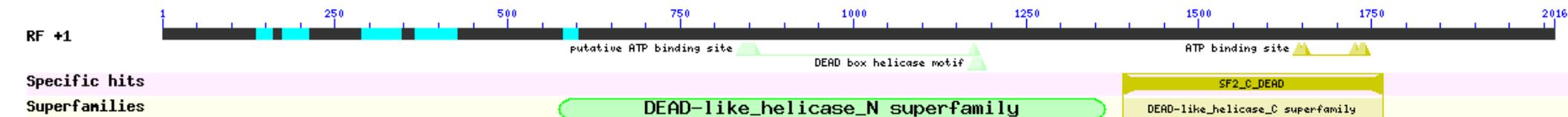
Etapa	Temperatura em °C	Tempo em minutos
Desnaturação inicial	94	5
Desnaturação	94	0,45
Anelamento	60	0,30
Extensão	72	1
Extensão final	72	10
Finalização PCR	4	infinito

**Tabela 3**

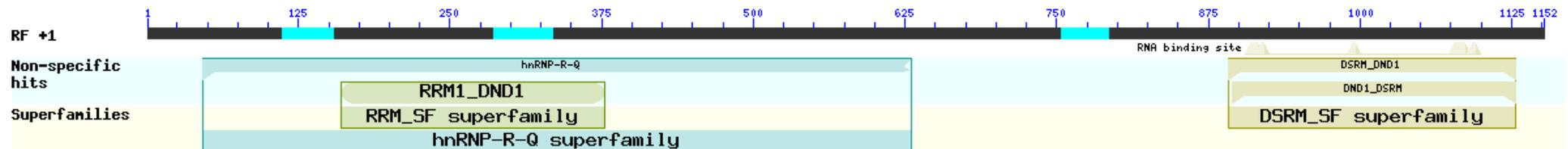
Etapa	Temperatura em °C	Tempo em minutos
Desnaturação inicial	94	5
Desnaturação	94	0,45
Anelamento	57	0,30
Extensão	72	1
Extensão final	72	10
Finalização PCR	4	infinito

APENDICE B- Análise das sequências de aminoácidos de Ddx4 e Dnd1 de *P. mangurus* usando o programa Blastx do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para identificação dos motivos proteicos. Imagem A- Regiões dos motivos envolvidos na função de helicase dependente de ATP. O DEAD-box helicases são uma família diversificada de proteínas envolvidas no desenrolamento do RNA dependente de ATP, necessárias em uma variedade de processos celulares, incluindo splicing, biogênese de ribossomos e degradação de RNA. Local de ligação do ATP no domínio conservado SF2\_C\_DEAD. Imagem B- Regiões dos motivos funcionais característicos de Dnd1. DND1 contém dois motivos de reconhecimento de RNA (RRMs) e um motivo de ligação de RNA de fita dupla C-terminal (DSRM) que não é específico de sequência, mas é altamente específico para dsRNAs de várias origens e estruturas. Motivo de reconhecimento de RNA 1 (RRM1) ou motivo de ligação de RNA, codifica a proteína de interação de fita simples que é essencial para a manutenção de células germinativas viáveis em vertebrados interagindo com a região 3' UTR de múltiplos RNAs mensageiros (mRNAs) e previne a repressão de mRNA mediada por micro-RNA (miRNA).

**A**



**B**



APÊNDICE C- Padrão de migração de PGCs *in vivo* durante o desenvolvimento de *A. altiparanae*. Figura A- gástrula com 70% de epibolia, B- gástrula com 90% de epibolia, C- segmentação com 10 somitos, D- segmentação com 20 somitos, E- eclosão. As barras representam 200  $\mu\text{m}$ . Nas ilustrações representando às imagens em A, B, C, D e E, observa se a blastoderme (b), vitelo (v), placa neural (p), somitos (s) e saco vitelínico (s.v). As zetas indicam os deslocamentos das PGCs (pontos vermelhos) apresentados durante as fases do desenvolvimento mencionadas.

