UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

JOSE LUIS ENRIQUE GARCIA CANDELA

O GENE *VASA* COMO MARCADOR MOLECULAR NA ESPERMATOGÊNESE DE *Colossoma macropomum* E *Piaractus brachypomus*

Porto Alegre

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

O GENE *VASA* COMO MARCADOR MOLECULAR NA ESPERMATOGÊNESE DE *Colossoma macropomum* E *Piaractus brachypomus*

JOSE LUIS ENRIQUE GARCIA CANDELA

Médico Veterinário/Universidad Nacional Mayor de San Marcos-UNMSM/Perú

Mestre em Farmacologia/Universidad Nacional Mayor de San Marcos-UNMSM/Perú

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Zootecnia
Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

Porto Alegre (RS), Brasil

Agosto de 2025

CIP - Catalogação na Publicação

Garcia Candela, Jose Luis Enrique
O GENE VASA COMO MARCADOR MOLECULAR NA ESPERMATOGÊNESE DE Colossoma macropomum E Piaractus brachypomus / Jose Luis Enrique Garcia Candela. -- 2025.
162 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2025.

1. Gene vasa. 2. Espermatogênese. 3. Biotecnologia reprodutiva. 4. Aquicultura amazônica. 5. Teleósteos. I. Streit Jr., Danilo Pedro, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jose Luis Enrique Garcia Candela
Mestre em Farmácia e Bioquímica

TESE

Submetida como parte dos requisitos

para obtenção do Grau de

DOUTOR EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 06.06.2025
Pela Banca Examinadora

Homologado em: **09/09/2025**
Por

Documento assinado digitalmente
gov.br
DANILO PEDRO STREIT JR
Data: 19/08/2025 14:55:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

DANILo PEDRo STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
orientador

Ines Andretta
Assinado de forma digital por Ines Andretta
Dados: 2025.09.10 11:11:59 -03'00'

INES ANDRETTA
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Documento assinado digitalmente
gov.br
FERNANDA DE MELLO
Data: 25/08/2025 14:04:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Fernanda de Mello
Autônoma

Documento assinado digitalmente
gov.br
FERNANDA LOUREIRO DE ALMEIDA OSULLIVAN
Data: 25/08/2025 09:54:20-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Fernanda Loureiro de Almeida o'sullivan
EMBRAPA

Documento assinado digitalmente
gov.br
NIVALDO FERREIRA DO NASCIMENTO
Data: 20/08/2025 09:10:16-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Nivaldo Ferreira do Nascimento
UFRPE

Documento assinado digitalmente
gov.br
PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Data: 10/09/2025 11:37:33-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

PAULo VITOR DUTRA DE SOUZA
Diretor da Faculdade de Agronomia

DEDICATÓRIA

A mim mesmo, por ser teimoso o suficiente para perseguir um sonho durante anos. Pensei que chegaria jovem com este título debaixo do braço, mas acontece que a vida não lê calendários. Descobri que os sonhos que chegam tarde têm melhor sabor: têm o gosto da persistência e a textura da experiência. Ao meu eu jovem que sonhou com isso, ao meu eu de antes que se angustiou com os tempos, e ao meu eu atual que finalmente entendeu que alguns objetivos melhoram com a idade, como o bom vinho ou as ideias complexas.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Victoria Candela, por sempre acreditar em mim apesar de tudo, por ser minha fonte inesgotável de apoio e por nunca ter duvidado de que este momento chegaria.

À minha tia Rosa Candela, por ter me ensinado disciplina desde jovem, lições que se tornaram os alicerces desta jornada acadêmica.

Aos meus queridos avós Henry Candela e Zoila Bocanegra (in memoriam), cujo amor e sabedoria continuam a me guiar e inspirar mesmo após sua partida.

Ao meu orientador, Dr. Danilo Streit Jr., por sua valiosa orientação durante todo o processo do doutorado, por sua paciência infinita com minhas dúvidas e por ter acreditado no potencial desta pesquisa desde o início.

RESUMO

O gene *vasa* como marcador molecular na espermatogênese de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*[1]

Autor: Jose Luis Enrique Garcia Candela

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

A preservação da diversidade genética em peixes é um desafio crucial para garantir a sustentabilidade da aquicultura e proteger espécies em risco de extinção. *Colossoma macropomum* (tambaqui) e *Piaractus brachypomus* (pirapitinga) são duas espécies de grande importância econômica para a aquicultura amazônica, cuja intensificação produtiva sem estratégias adequadas de reposição genética pode reduzir a variabilidade genética das populações. O gene *vasa*, que codifica uma helicase de RNA dependente de ATP da família DEAD-box, tem sido identificado como um marcador específico de células germinativas em diversos organismos, oferecendo possibilidades para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas. Esta tese teve como objetivo caracterizar a expressão do gene *vasa* durante a espermatogênese em tambaqui e pirapitinga e analisar suas aplicações em biotecnologias reprodutivas de peixes. O primeiro estudo realizou uma revisão sistemática sobre as aplicações biotecnológicas do gene *vasa* em células germinativas de teleósteos, analisando 44 estudos que abrangeram 27 espécies de 10 ordens diferentes. As principais aplicações identificadas incluíram transplante de células germinativas (31,8%), criopreservação (27,3%), esterilização reprodutiva (18,2%) e transgênese (15,9%). A revisão revelou concentração excessiva em espécies modelo e sub-representação de espécies tropicais amazônicas, além de inconsistências metodológicas e ausência de validação inter-laboratorial em 77% dos estudos. O segundo estudo analisou a expressão do gene *vasa* em diferentes grupos etários (1, 3 e 5 anos) de ambas as espécies por meio de análise histológica e qPCR. Os resultados confirmaram especificidade gonadal da expressão de *vasa* em ambas espécies, com expressão estritamente restrita aos testículos e ausência em tecidos somáticos. Um achado significativo foi a diferença quantitativa entre espécies, com *P. brachypomus* apresentando níveis aproximadamente 10.000 vezes superiores aos de *C. macropomum*. A análise histológica revelou que indivíduos de 3 anos apresentaram túbulos seminíferos bem desenvolvidos com maior densidade espermatogonial,

correlacionando-se com tendências de pico de expressão de *vasa* nesta idade. Embora indivíduos de 3 anos representem teoricamente doadores ótimos, indivíduos de 1 ano com expressão detectável de *vasa* e espermatogônias viáveis oferecem vantagens práticas significativas em termos de disponibilidade, custo e facilidade de manejo. Esta pesquisa estabelece o gene *vasa* como marcador germinal confiável em tambaqui e pirapitinga, fornecendo dados essenciais para implementar biotecnologias reprodutivas cruciais para preservar a diversidade genética nestas valiosas espécies aquícolas amazônicas.

Palavras-chave: Gene *vasa*; espermatogênese; biotecnologia reprodutiva; aquicultura amazônica; teleósteos.

[1] Dissertação de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (162 p.) agosto, 2025.

ABSTRACT

The *vasa* gene as a molecular marker in spermatogenesis of *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*[2]

Author: Jose Luis Enrique Garcia Candela

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

Preserving genetic diversity in fish is a crucial challenge to ensure aquaculture sustainability and protect species at risk of extinction. *Colossoma macropomum* (tambaqui) and *Piaractus brachypomus* (pirapitinga) are two economically important species for Amazonian aquaculture, whose productive intensification without adequate genetic replacement strategies may reduce population genetic variability. The *vasa* gene, which encodes an ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family, has been identified as a specific marker of germ cells in various organisms, offering possibilities for developing reproductive biotechnologies. This thesis aimed to characterize *vasa* gene expression during spermatogenesis in tambaqui and pirapitinga and analyze its applications in fish reproductive biotechnologies. The first study conducted a systematic review of biotechnological applications of the *vasa* gene in teleost germ cells, analyzing 44 studies covering 27 species from 10 different orders. The main applications identified included germ cell transplantation (31.8%), cryopreservation (27.3%), reproductive sterilization (18.2%), and transgenesis (15.9%). The review revealed excessive concentration on model species and under-representation of Amazonian tropical species, in addition to methodological inconsistencies and absence of inter-laboratory validation in 77% of studies. The second study analyzed *vasa* gene expression in different age groups (1, 3, and 5 years) of both species through histological analysis and qPCR. Results confirmed gonadal specificity of *vasa* expression in both species, with expression strictly restricted to testes and absence in somatic tissues. A significant finding was the quantitative difference between species, with *P. brachypomus* presenting levels approximately 10,000 times higher than *C. macropomum*. Histological analysis revealed that 3-year-old individuals presented well-developed seminiferous tubules with higher spermatogonial density, correlating with peak *vasa* expression trends at this age. Although 3-year-old individuals theoretically represent optimal donors, 1-year-old specimens with detectable *vasa* expression and viable spermatogonia offer

significant practical advantages in terms of availability, cost, and handling ease. This research establishes the *vasa* gene as a reliable germinal marker in tambaqui and pirapitinga, providing essential data to implement reproductive biotechnologies crucial for preserving genetic diversity in these valuable Amazonian aquaculture species.

Keywords: *Vasa* gene; spermatogenesis; reproductive biotechnology; Amazonian aquaculture; teleosts.

[2] Doctoral dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (162 p.) August, 2025.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Espécies amazônicas de importância aquícola.....24

FIGURA 2. Sistema dentário especializado. *C. macropomum* com dentição robusta e contínua 25

FIGURA 3. Modelo conceitual da terminologia de fases reprodutivas em teleósteos 30

FIGURA 4. Histologia do estádio Imaturo em testículos de teleósteos.....31

FIGURA 5. Histologia do estádio Regenerando em testículos de teleósteos.....32

FIGURA 6. Histologia do estádio em desenvolvimento em testículos de teleósteos. 33

FIGURA 7. Histologia do estádio Capaz de desovar em testículos de teleósteos.....34

FIGURA 8. Histologia do estádio regredindo em testículos de teleósteos.....35

FIGURA 9. Comparação entre espermatogênese não cística (mamíferos) e cística (peixes).....37

FIGURA 10. Gerações espermatogônias em peixes teleósteos.....45

FIGURA 11. Graphical representation of the PRISMA flowchart detailing the procedure for selecting studies.....108

FIGURA 12. Number of articles per year on the application of vasa expression in fish germ cell biotechnologies (2000-2024) 109

FIGURA 13. Distribution of biotechnological analyses in studies employing vasa expression as an indicator of germ cells in teleost fish…….....109

FIGURA 14. Distribution of studies by taxonomic order highlighting the main model and aquaculture species used in vasa-based biotechnology research.....110

FIGURA 15. Venn diagram representation showing how the main methods used to detect vasa expression relate to biotechnological objectives in the studies reviewed 110

FIGURA 16. Histological characterization of testicular reproductive phases in *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*……....138

FIGURA 17. Tissue-specific expression of *vasa* gene in *C. macropomum* and *P. brachypomus*.....140

FIGURA 18. Reproductive phase-dependent expression of *vasa* gene in testes of *Colossoma macropomum*…….....141

FIGURA 19. Reproductive phase-dependent expression of *vasa* gene in testes of *Piaractus brachypomus*…….....142

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Search strategies used in different databases to identify relevant studies on vasa expression in teleost fish and germ cells 110

TABELA 2. Inclusion and exclusion criteria 110

TABELA 3. Summary of studies analyzed in the systematic review on the utilization of vasa expression in biotechnological technologies related to germ cells of teleost fish. It details the investigated species, biotechnological uses, vasa detection techniques, types of germ cells, and key findings of each study 114

TABELA 4. Summary of important findings and implications for each biotechnological application based on vasa expression in teleost fish 120

TABELA 5. Biometric and reproductive parameters of male *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus* from different reproductive phases.....140

TABELA 6. Primer sequences used for amplification of vasa and β-actin genes in *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*, including product size …..140

SUMÁRIO

RESUMO.....7

ABSTRACT.....9

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....11

LISTA DE TABELAS.....13

CAPÍTULO I 17

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

1. INTRODUÇÃO GERAL 18

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22

2.1. As espécies amazônicas: Piaractus brachypomus e Colossoma macropomum..22

2.1.1. Origem evolutiva e classificação taxonômica.....22

2.1.2. Morfologia funcional e adaptações ecológicas.....23

2.1.3. Ecologia trófica e papel na dispersão de sementes.....26

2.1.4. Fisiologia reprodutiva e ciclos sazonais.....27

2.1.5. Desenvolvimento larval e ontogenia inicial.....28

2.2. Desenvolvimento gonadal e espermatogênese em teleósteos: Um processo altamente regulado.....28

2.2.1. Conceituação moderna do desenvolvimento gonadal.....28

2.2.2. Classificação de estádios de desenvolvimento gonadal: O sistema Brown-Peterson.....29

2.2.3. Arquitetura testicular e organização celular.....38

2.2.4. Regulação hormonal da espermatogênese.....40

2.2.5. Fases da espermatogênese: De espermatogônias a espermatozoides.....42

2.3. O gene vasa: Arquiteto molecular da linhagem germinal.....45

2.3.1. Descobrimento histórico e significado evolutivo.....45

2.3.2. Estrutura genômica e organização molecular.....47

2.3.3. Estrutura e domínios funcionais da proteína VASA.....48

2.3.4. Função molecular e mecanismos de ação.....50

2.3.5. Regulação da expressão do gene vasa.....52

2.3.6. Expressão do gene vasa durante o desenvolvimento gonadal.....54

2.4. Técnicas moleculares para o estudo da expressão gênica.....57

2.4.1. PCR quantitativa em tempo real (qPCR): Fundamentos e aplicações.....57

2.4.2. Hibridação in situ: Localização espacial de transcritos.....59

2.4.3. Análise histológica quantitativa.....60

2.5. Aplicações biotecnológicas do gene vasa: Revolução em biotecnologias reprodutivas.....61

2.5.1. vasa como marcador molecular: Identificação e purificação de células germinativas.....61

2.5.2. Otimização de protocolos de criopreservação.....62

2.5.3. Transplante de células germinativas: Tecnologia de substituição.....63

2.5.4. Desenvolvimento de linhagens transgênicas.....64

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS 66

3.1 Hipótese 66

3.2 Objetivos 66

3.2.1 Objetivo geral 66

3.2.2 Objetivos específicos 66

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

CAPÍTULO II 86

Applications of VASA Expression in the Germ Cell Biotechnology of Fish: A Systematic Review 87

Abstract 88

Introduction 89

Methodology.....90

Results 93

Discussion 96

Conclusion 98

References 100

CAPÍTULO III 118

Comparative analysis of vasa gene expression during spermatogenesis in *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*: implications for spermatogonia cryopreservation 119

Abstract 120

Introduction 121

Methodology 122

Results 126

Discussion 128

Conclusion 133

References 132

Supplementary material.....143

CAPÍTULO IV 145

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....145

APÊNDICE.....149

VITA.....162

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura mundial experimentou um crescimento exponencial nas últimas décadas, consolidando-se como uma das atividades produtivas mais dinâmicas do setor alimentar global. Neste contexto, a preservação e manejo eficiente da diversidade genética em peixes emerge como um dos desafios mais críticos para garantir a sustentabilidade a longo prazo dos sistemas de produção aquícola e a conservação de espécies nativas em risco de extinção (Gjedrem; Robinson; Rye, 2012; Lorenzen; Beveridge; Mangel, 2012).

A região amazônica, reconhecida mundialmente como o reservatório de biodiversidade aquática mais importante do planeta, abriga espécies ícticas de extraordinário valor ecológico e econômico. Entre essas espécies, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) destacam-se como pilares fundamentais da aquicultura neotropical (Lovshin, 1998). Essas espécies, pertencentes à família *Serrasalmidae*, demonstraram adaptabilidade excepcional a sistemas de cultivo intensivo, registrando taxas de crescimento superiores a 1,5 kg/ano em condições ótimas e exibindo notável resistência a doenças e variações de qualidade da água (Val; de Oliveira, 2021).

A importância econômica reflete-se nas cifras de produção regional: o tambaqui representa aproximadamente 65% da produção aquícola continental da América do Sul, com volumes que superam as 150.000 toneladas anuais, enquanto a pirapitinga contribui com cerca de 25.000 toneladas adicionais (FAO, 2020). Essa demanda crescente impulsionou uma intensificação significativa dos sistemas de reprodução, caracterizada por protocolos de indução hormonal que permitem a obtenção controlada de gametas e produção massiva de alevinos (Nuñez *et al.*, 2008).

Contudo, essa intensificação reprodutiva gerou uma problemática de profundas implicações genéticas. A prática generalizada de utilizar um número limitado de reprodutores elite, combinada com a ausência de estratégias sistemáticas de renovação genética, resultou em gargalos genéticos que comprometen a variabilidade genética das populações cultivadas (Santos *et al.*, 2016). Estudos recentes documentaram reduções significativas na heterozigosidade esperada de até 35% em populações cultivadas de tambaqui comparadas com populações selvagens. Essas

reduções são acompanhadas de incrementos alarmantes nos coeficientes de endogamia, que atingem valores de 0,15-0,25 (Gonçalves *et al.*, 2019).

Esta erosão genética se manifesta em múltiplos níveis fenotípicos que afetam a viabilidade produtiva. Os principais efeitos incluem: maior suscetibilidade a doenças, taxas de mortalidade larval que podem superar 40% durante as primeiras semanas de vida, redução na eficiência de conversão alimentar de até 15%, e diminuição na tolerância a variações ambientais (Lopera-Barrero, 2009).

Em resposta a essa problemática, a comunidade científica tem direcionado esforços para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas avançadas. Essas tecnologias visam permitir a preservação, manipulação e utilização eficiente do material genético. Essas tecnologias incluem a criopreservação de gametas e células germinativas, o transplante de células germinativas primordiais e espermatogônias, a transgênese mediada por células germinativas, e o desenvolvimento de linhagens celulares germinativas imortalizadas (Robles *et al.*, 2017; Yoshizaki *et al.*, 2011).

A implementação bem-sucedida dessas biotecnologias depende fundamentalmente da capacidade para identificar, caracterizar e manipular com precisão as células germinativas em diferentes estádios de desenvolvimento gonadal. Nesse contexto, a identificação de marcadores moleculares específicos e confiáveis para células germinativas constitui um pré-requisito essencial. Entre os diversos marcadores investigados, o gene *vasa* emergiu como o mais específico e evolutivamente conservado (Raz, 2000).

O gene *vasa*, inicialmente descoberto em *Drosophila melanogaster* (Hay; Jan; Jan, 1988), codifica uma RNA helicase dependente de ATP pertencente à família DEAD-box que desempenha funções cruciais na determinação da linhagem germinativa, na migração de células germinativas primordiais, e na regulação da gametogênese (Hartung; Forbes; Marlow, 2014). A proteína *VASA* caracteriza-se por sua expressão altamente específica em células germinativas, desde as etapas mais precoces do desenvolvimento embrionário até os estádios avançados da gametogênese, convertendo-a em um marcador molecular ideal (Vasconcelos *et al.*, 2019).

A expressão do gene *vasa* exibe padrões dinâmicos e estádio-específicos durante o desenvolvimento gonadal que refletem os processos complexos de proliferação, diferenciação e maturação das células germinativas. Em teleósteos, numerosos

estudos documentaram níveis de expressão diferenciais correlacionados com o estádio de desenvolvimento gonadal, a fase do ciclo reprodutivo, e o tipo celular específico (Raghuveer; Senthilkumaran, 2010; Xu; Gui; Hong, 2005). Durante a espermatogênese, a expressão atinge seus níveis máximos em espermatogônias tipo A indiferenciadas, as quais representam a população de células-tronco espermatogoniais responsáveis pela manutenção da capacidade regenerativa testicular (Schulz *et al.*, 2010).

Esta característica converte o gene *vasa* em um indicador molecular preciso para identificar estádios de desenvolvimento gonadal ótimos para a obtenção de células germinativas destinadas a aplicações biotecnológicas específicas. A literatura sugere que estádios precoces, particularmente os estádios imaturo e de regeneração, poderiam abrigar as maiores concentrações de espermatogônias indiferenciadas com alta expressão de *vasa*, convertendo-os em fontes ideais para procedimentos de criopreservação e transplante celular (Lee; Iwasaki; Yoshizaki, 2016).

Apesar da importância fundamental dessas espécies para a aquicultura amazônica e do potencial significativo das biotecnologias reprodutivas para a conservação de seus recursos genéticos, o conhecimento atual sobre os padrões de expressão do gene *vasa* durante o desenvolvimento gonadal de *C. macropomum* e *P. brachypomus* permanece fragmentário. Os estudos prévios se limitaram principalmente à caracterização molecular básica do gene *vasa* em tambaqui (Vasconcelos *et al.*, 2019), sem abordar sistematicamente a relação entre os níveis de expressão e os estádios específicos de desenvolvimento gonadal, nem explorar as implicações práticas para a otimização de protocolos biotecnológicos.

O presente estudo aborda essas limitações mediante um enfoque multidisciplinar que combina técnicas de biologia molecular, histologia quantitativa e análise estatística avançada. A pesquisa estrutura-se em torno da hipótese de que os estádios precoces de desenvolvimento gonadal em *C. macropomum* e *P. brachypomus* caracterizam-se por níveis de expressão elevados do gene *vasa*, correlacionados com maiores densidades de espermatogônias indiferenciadas, convertendo-os em estádios ótimos para a obtenção de células germinativas destinadas a aplicações biotecnológicas.

Os resultados esperados incluem o estabelecimento de um protocolo padronizado para a identificação molecular de estádios de desenvolvimento gonadal ótimos para

biotecnologias reprodutivas, a geração de uma base de dados quantitativa de referência para os padrões de expressão de *vasa* nessas espécies amazônicas, e a contribuição ao conhecimento fundamental dos mecanismos moleculares que regulam a gametogênese em teleósteos neotropicais. A relevância transcende o âmbito acadêmico, projetando-se para aplicações práticas de alto impacto para a sustentabilidade da aquicultura amazônica e a conservação da biodiversidade regional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. As espécies amazônicas: *Piaractus brachypomus* e *Colossoma macropomum*

No vasto cenário da biodiversidade íctica amazônica, no qual confluem mais de 3.000 espécies de peixes em um intrincado tecido evolutivo de 60 milhões de anos, duas espécies emergiram como protagonistas indiscutíveis da revolução aquícola sul-americana: *Piaractus brachypomus* (tambaqui branco ou pirapitinga) e *Colossoma macropomum* (tambaqui ou gamitana). Essas espécies, cuja história evolutiva se entrelaça com os ciclos hidrológicos milenários das bacias do Amazonas e Orinoco, representam não apenas um sucesso adaptativo excepcional em termos evolutivos, mas também uma oportunidade única para o desenvolvimento de sistemas aquícolas sustentáveis em regiões tropicais (Goulding; Carvalho, 1982; Lovshin, 1998).

2.1.1. Origem evolutiva e classificação taxonômica

A família *Serrasalmidae*, à qual pertencem ambas as espécies, constitui uma das linhagens mais bem-sucedidas de peixes de água doce neotropicais, com uma radiação adaptativa que abrange desde especialistas piscívoros altamente agressivos (piranhas) até herbívoros-frugívoros de grande porte como nossas espécies de interesse. As análises filogenéticas mais recentes, baseadas em sequenciamento do genoma completo e análises filogenômicas massivas, revolucionaram nossa compreensão das relações evolutivas dentro desta família (Kolmann *et al.*, 2021; Thompson *et al.*, 2014).

Piaractus brachypomus foi descrita originalmente por Cuvier em 1818, baseando-se em espécimes coletados na bacia amazônica. Contudo, investigações genéticas recentes revelaram uma complexidade taxonômica previamente insuspeita. Os estudos de Escobar L. *et al.*, (2015) e Escobar L *et al.*, (2019), utilizando marcadores moleculares de alta resolução incluindo sequências mitocondriais completas e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) distribuídos ao longo do genoma nuclear, demonstraram que o que

tradicionalmente se considerava uma única espécie amplamente distribuída representa na realidade um complexo de espécies crípticas.

A descoberta mais significativa foi a identificação de *P. orinoquensis* como uma espécie distinta, endêmica da bacia do Orinoco, geneticamente diferenciada de *P. brachypomus* sensu stricto, que permanece restrita à bacia amazônica (Escobar L *et al.*, 2019). Essa descoberta, inicialmente motivada pela busca genética de 3,2% no gene citocromo oxidase I (COI) e padrões distintivos de polimorfismos nucleares, sugere um processo de especiação alopátrica iniciado durante o Pleistoceno médio, há aproximadamente 1,2 milhões de anos, coincidindo com eventos de reorganização hidrográfica que separaram ambas as bacias (Lundberg *et al.*, 1998).

Colossoma macropomum, por sua vez, mantém uma distribuição mais ampla que abrange ambas as bacias, embora estudos populacionais tenham identificado estruturação genética significativa entre populações de diferentes sub-bacias, sugerindo processos de diferenciação populacional incipiente que poderiam ter implicações importantes para programas de conservação e manejo genético em aquicultura (Ortí *et al.*, 2008; Santos; Ferreira; Zuanon, 2007).

2.1.2. Morfologia funcional e adaptações ecológicas

A morfologia externa de ambas as espécies reflete uma adaptação excepcional a nichos ecológicos específicos dentro dos ecossistemas de várzea amazônicos. Seus corpos lateralmente comprimidos e de perfil alto, com nadadeiras robustas e musculatura axial altamente desenvolvida, representam um compromisso evolutivo ótimo entre a necessidade de manobrar eficientemente em ambientes estruturalmente complexos (florestas inundadas) e a capacidade de realizar migrações extensas durante os ciclos reprodutivos (Lovshin, 1998; Lucas, 2008) (Figura 2.1).

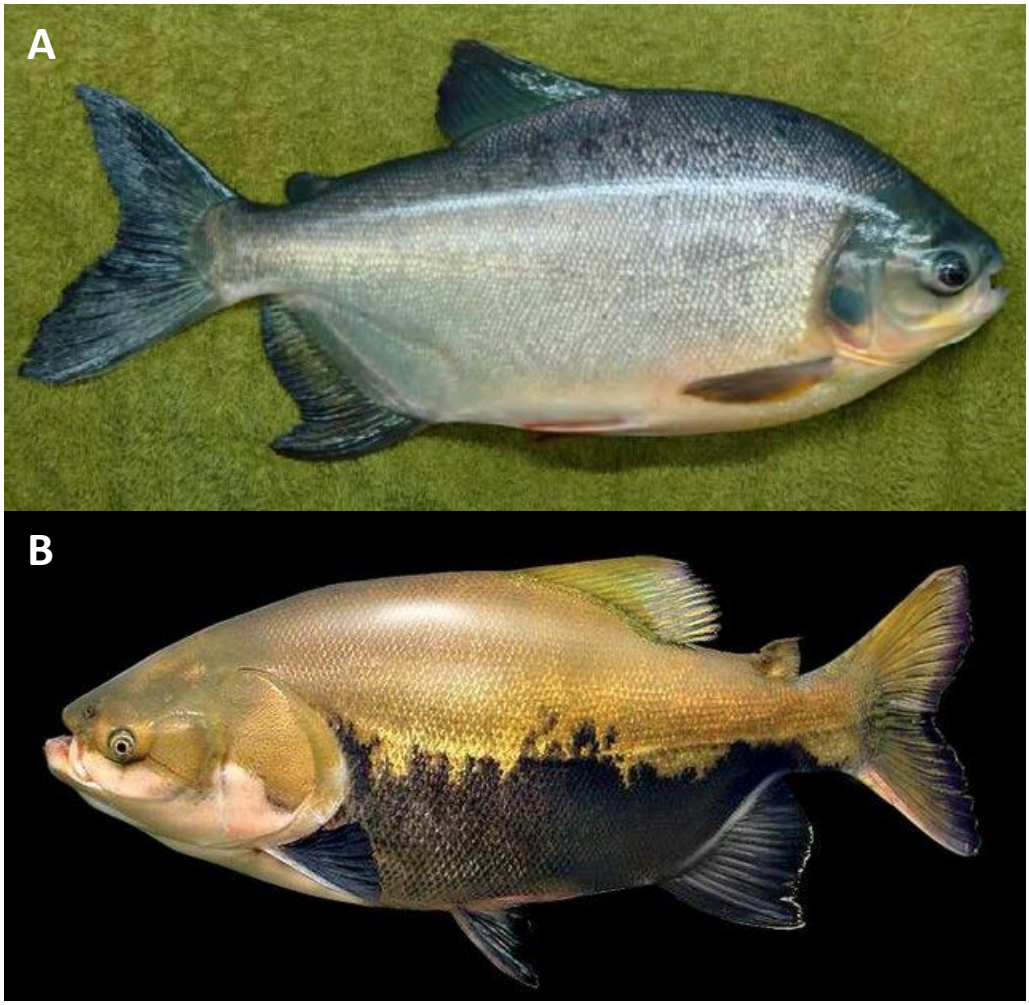

Figura 2.1. Espécies amazônicas de importância aquícola. (A) *Piaractus brachypomus* (pirapitinga). (B) *Colossoma macropomum* (tambaqui). Observar as diferenças morfológicas distintivas entre as espécies. Fonte: Landines; Rocriguez; Rodriguez, (2011) - Streit *et al.*,(2015).

A característica morfológica mais distintiva e funcionalmente significativa dessas espécies reside em seu sistema dentário altamente especializado. *P. brachypomus* apresenta uma configuração dental única consistindo em duas séries de dentes molariformes na pré-maxila, separadas por um espaço triangular característico que atua como uma estrutura de retenção para sementes de grande tamanho durante o processamento alimentar (Ruiz-Carus, 2003). Esta configuração contrasta com a de *C. macropomum*, que exibe dentes molariformes mais robustos e contínuos, sem espaços intersticiais, refletindo uma especialização para o processamento de frutos e sementes de dureza extrema (Berkovitz; Shellis, 2020) (Figura 2.2).



Figura 2.2. Sistema dentário especializado. *C. macropomum* com dentição robusta e contínua. Fonte. Berkovitz; Shellis, (2020)

Estudos biomecânicos recentes quantificaram as forças de mordida dessas espécies, registrando valores excepcionais que atingem os 320 N em indivíduos adultos de *C. macropomum*, equivalentes às forças exercidas por mamíferos terrestres de tamanho similar. Esta capacidade mastigatória extraordinária lhes permite acessar recursos alimentares inacessíveis para outros peixes, incluindo frutos com testas lenhosas e sementes com endospermas endurecidos, estabelecendo seu papel ecológico como

dispersores de sementes de longo alcance nos ecossistemas amazônicos (Anderson *et al.*, 2011; Correa *et al.*, 2007). Ambas as espécies apresentam espermatogênese do tipo cística, característica de teleósteos que será detalhada na seção de desenvolvimento gonadal.(Schulz *et al.*, 2010).

2.1.3. Ecologia trófica e papel na dispersão de sementes

A ecologia alimentar de *P. brachypomus* e *C. macropomum* representa um dos casos mais fascinantes de coevolução planta-animal documentado em ecossistemas neotropicais. Durante as estações de inundação, que se estendem de dezembro a junho na maioria das bacias amazônicas, esses peixes migram massivamente para as áreas de várzea inundadas, nas quais estabelecem interações tróficas complexas com mais de 200 espécies de plantas vasculares (Goulding, 1980; Lucas, 2008).

A análise do conteúdo estomacal de indivíduos capturados em diferentes ambientes e estações revelou uma dieta extraordinariamente diversa que inclui frutos de *Ficus* spp., sementes de *Hevea brasiliensis*, *Astrocaryum* spp., *Mauritia flexuosa*, e uma variedade de material vegetal flutuante. A eficiência digestiva para diferentes tipos de material vegetal varia consideravelmente: os frutos carnosos mostram digestibilidades de 85-92%, enquanto as sementes oleaginosas atingem valores de 65-78%, e o material fibroso vegetal apresenta digestibilidades mais baixas de 45-60% (Lovshin, 1998; Saint-Paul, 1986).

A capacidade de dispersão de sementes dessas espécies foi quantificada mediante estudos de marcação e recaptura que documentaram distâncias de dispersão de até 15 km para sementes de *Cecropia* spp. e 8 km para sementes de *Ficus insipida* (Horn, 1997; Lucas, 2008). Esses dados posicionam ambas as espécies como dispersoras de sementes de importância crítica para a manutenção da conectividade genética de populações vegetais em paisagens fragmentadas de várzea.

2.1.4. Fisiologia reprodutiva e ciclos sazonais

A biologia reprodutiva de *P. brachypomus* e *C. macropomum* está intimamente sincronizada com os ciclos hidrológicos amazônicos, representando uma adaptação evolutiva que maximiza o sucesso reprodutivo mediante a sincronização temporal entre a disponibilidade de recursos alimentares e as condições ambientais ótimas para o desenvolvimento larval (Vazzoler, 1996; Winemiller; Jepsen, 1998).

O ciclo reprodutivo inicia-se durante a estação seca (agosto-novembro), quando os níveis hormonais basais de gonadotropinas (FSH e LH) começam a incrementar-se gradualmente em resposta a sinais ambientais específicos, incluindo mudanças na duração do fotoperíodo, redução da temperatura noturna, e modificações na condutividade elétrica da água associadas com a concentração de nutrientes durante o período de águas baixas (Chellappa *et al.*, 1989; Loubens; Panfili, 2001).

A gametogênese progride durante os meses de transição (setembro-dezembro), caracterizando-se por um incremento exponencial no índice gonadossomático (IGS) que pode atingir valores de 12-15% em fêmeas maduras e 3-4% em machos. Durante este período, os níveis de estradiol-17β em fêmeas incrementam-se desde valores basais de 0,5-1,0 ng/ml até picos pré-ovulatórios de 15-25 ng/ml, enquanto os níveis de 11-cetotestosterona em machos aumentam desde 2-3 ng/ml até 25-40 ng/ml durante a espermiação (Chellappa *et al.*, 1989; Núñez; Duponchelle, 2009).

A migração reprodutiva inicia-se com as primeiras chuvas (dezembro-janeiro), quando grupos de reprodutores abandonam as áreas de alimentação nas várzeas e lagos marginais para dirigir-se aos canais principais dos rios. Essas migrações, que podem estender-se por distâncias de 200-500 km, estão mediadas por mecanismos de navegação complexos que incluem orientação magnética, detecção de gradientes químicos (feromônios), e reconhecimento de características geomorfológicas específicas dos sítios de desova (Barthem; Goulding, 1997; Carolsfeld *et al.*, 2003).

2.1.5. Desenvolvimento larval e ontogenia inicial

O desenvolvimento embrionário e larval dessas espécies tem sido objeto de estudos detalhados devido à sua importância para a otimização de protocolos de reprodução artificial em aquicultura. Os ovos, de tipo pelágico com diâmetros de 0,9-1,2 mm, apresentam uma densidade ligeiramente inferior à da água (0,995-0,998 g/cm³), o que lhes permite manter uma posição neutralmente flutuante na coluna de água durante o desenvolvimento embrionário (Núñez *et al.*, 2011; Reynalte-Tataje *et al.*, 2004).

O desenvolvimento embrionário, altamente dependente da temperatura, apresenta uma duração de 14-18 horas a 28°C, com eventos críticos de diferenciação celular que incluem a gastrulação (4-5 horas pós-fertilização), a neurulação (8-10 hpf), e a diferenciação dos primórdios de nadadeiras (12-14 hpf). A eclosão ocorre quando as larvas atingem um comprimento de 2,8-3,2 mm e esgotaram aproximadamente 60% das reservas vitelínicas (Beux; Zaniboni Filho, 2007; de Oliveira *et al.*, 2012).

O período larval caracteriza-se por transformações morfológicas e fisiológicas dramáticas que incluem a transição desde a respiração cutânea para a respiração branquial (72-96 horas pós-eclosão), o desenvolvimento do sistema digestivo funcional com o aparecimento das primeiras enzimas digestivas ativas (proteases, lipases, amilases) às 96-120 hpe, e a inflação da bexiga natatória, um evento crítico que ocorre entre as 48-72 hpe e determina em grande medida a sobrevivência larval (Jomori *et al.*, 2003).

2.2. Desenvolvimento gonadal e espermatogênese em teleósteos: Um processo altamente regulado

2.2.1. Conceituação moderna do desenvolvimento gonadal

O desenvolvimento gonadal em teleósteos representa um dos processos mais complexos e altamente regulados da ontogenia de vertebrados, caracterizado por uma sequência precisamente orquestrada de eventos moleculares, celulares e fisiológicos que culminam na produção de gametos funcionais

(Devlin; Nagahama, 2002; Schulz *et al.*, 2010). Este processo, que se estende desde as etapas mais iniciais do desenvolvimento embrionário até a maturidade sexual completa, envolve a coordenação de múltiplos sistemas regulatórios incluindo redes de sinalização hormonal, fatores de transcrição específicos de células germinativas, e mecanismos epigenéticos de regulação gênica (Raz, 2000; Siegfried; Nüsslein-Volhard, 2008)

A compreensão moderna do desenvolvimento gonadal foi revolucionada pela aplicação de tecnologias genômicas de alta resolução, incluindo análises transcriptômicas de célula única (scRNA-seq), mapeamento epigenômico completo, e técnicas de edição gênica dirigida (CRISPR/Cas9), que permitiram caracterizar com precisão sem precedentes os programas transcricionais que regulam a diferenciação de células germinativas primordiais (PGCs) em gametos maduros (Leu; Draper, 2010; Seki *et al.*, 2017).

Em teleósteos, a expressão de *vasa* segue padrões específicos durante a espermatogênese cística que refletem o estado de diferenciação das células germinativas. Os níveis mais altos observam-se em espermatogônias tipo A indiferenciadas, particularmente naquelas com características de células-tronco (Aund*), diminuindo progressivamente durante a diferenciação para espermatogônias tipo B e sendo praticamente indetectável em espermátides e espermatozoides maduros (Schulz *et al.*, 2010). Esta expressão diferencial converte *vasa* em um marcador ideal para identificar populações de células germinativas com maior potencial regenerativo e capacidade de colonização em procedimentos de transplante celular.

2.2.2. Classificação de estádios de desenvolvimento gonadal: O sistema Brown-Peterson

A necessidade de estabelecer um sistema de classificação universal para os estádios de desenvolvimento gonadal em peixes tem sido uma preocupação constante da comunidade científica dedicada à biologia reprodutiva de teleósteos. O sistema proposto por Brown-Peterson *et al.*, (2011), resultado de um esforço colaborativo internacional que envolveu mais de 50 especialistas

em reprodução de peixes, representa o consenso científico mais avançado para a classificação padronizada de fases reprodutivas em teleósteos.

Este sistema, baseado em critérios histológicos específicos e marcadores fisiológicos quantificáveis, estabelece seis fases principais de desenvolvimento reprodutivo: **Imaturo**, **Regenerando** (Regenerating), **Maduro** (Mature), **Em desenvolvimento** (Developing), **Capaz de desovar** (Spawning capable), e **Regredindo** (Regressing). Cada fase caracteriza-se por padrões distintivos de organização celular, distribuição de tipos celulares específicos, e marcadores moleculares associados (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Lowerre-Barbieri *et al.*, 2011) (Figura 2.3).

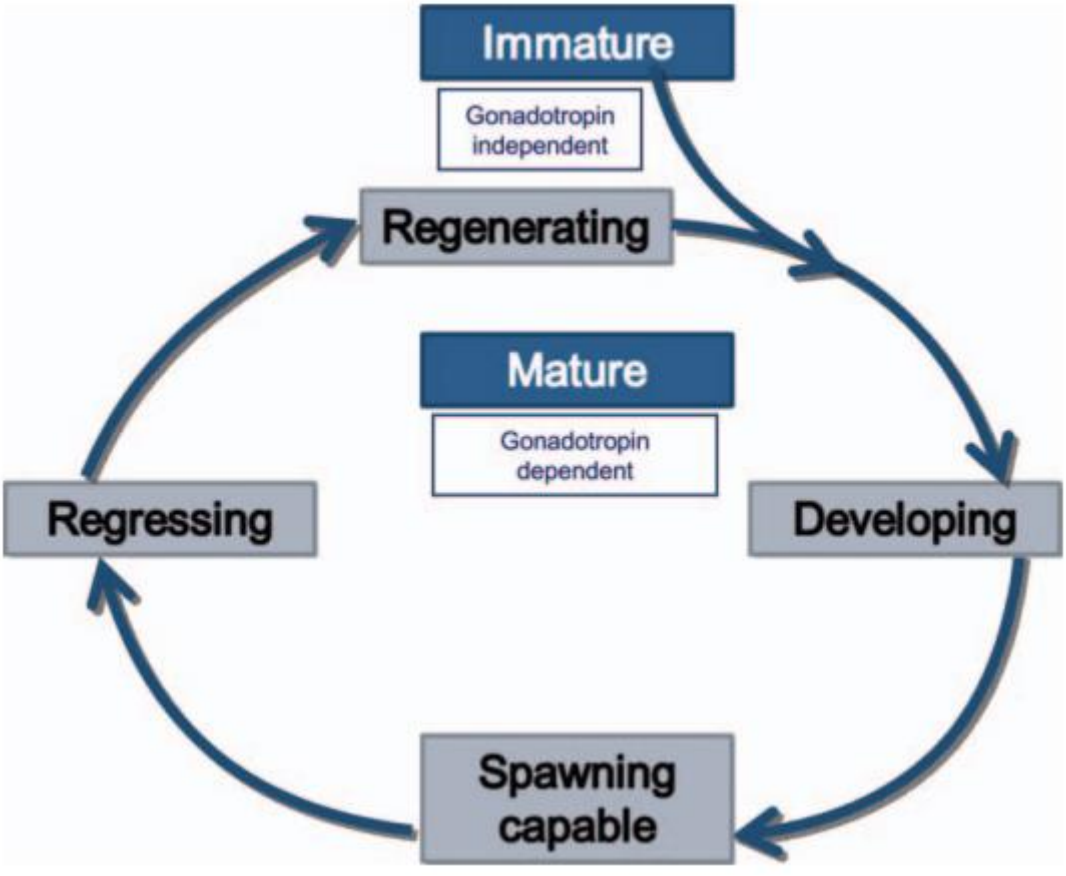

Figura 2.3. Modelo conceitual da terminologia de fases reprodutivas em teleósteos. Progressão cíclica entre estádios de desenvolvimento gonadal. Fonte: (Brown-Peterson *et al.*, 2011)

Estádio Imaturo: Caracteriza-se por gônadas de tamanho reduzido e filamentosas, com arquitetura tissular simples. Histologicamente, os testículos apresentam exclusivamente espermatogônias primárias (tipo A indiferenciadas) distribuídas na periferia de túbulos seminíferos rudimentares. As células somáticas de suporte (células de Sertoli precursoras) são escassas e morfologicamente indiferenciadas. Os ovários mostram unicamente ninhos de células germinativas primordiais e oogônias em estádios iniciais de diferenciação. Este estádio representa o ponto de partida do desenvolvimento reprodutivo e pode estender-se por períodos variáveis dependendo da espécie e das condições ambientais (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Grier; Taylor, 1998) (Figura 2.4).

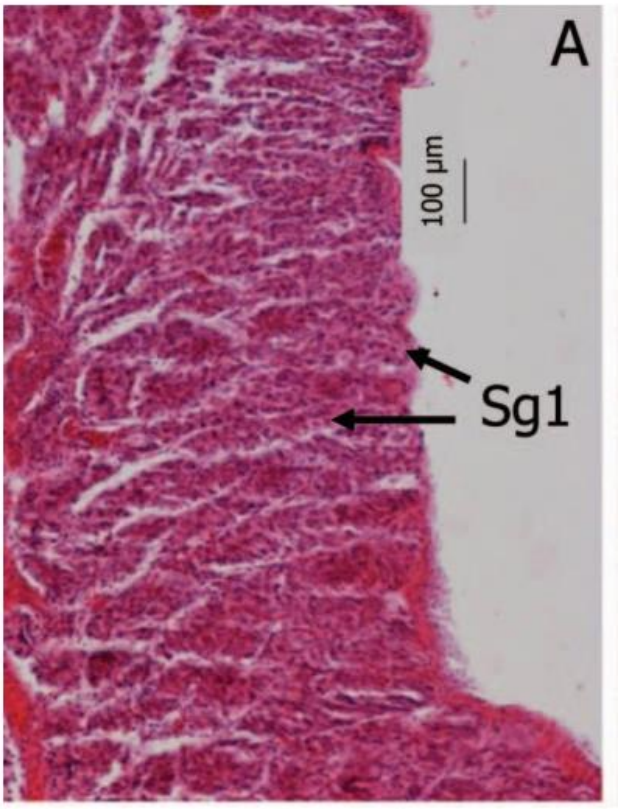

Figura 2.4. Histologia do estádio Imaturo em testículos de teleósteos. Fase reprodutiva imatura caracterizada por espermatogônias primárias (Sg1) distribuídas na periferia dos túbulos seminíferos rudimentares. Observar a arquitetura tissular simples e o tamanho reduzido das gônadas filamentosas

característico deste estádio inicial do desenvolvimento reprodutivo. Fonte: (Brown-Peterson *et al.*, 2011).

Estádio Regenerando: Corresponde a um período de transição caracterizado pelo incremento gradual do tamanho gonadal e a iniciação de processos de proliferação celular. Em testículos, observa-se um incremento no número de espermatogônias tipo A e o aparecimento das primeiras divisões mitóticas. A vascularização gonadal intensifica-se, e as células somáticas de suporte começam a mostrar sinais de diferenciação morfológica. Em ovários, as oogônias iniciam processos de crescimento com o aparecimento de oócitos perinucleolares em estádio inicial. Este estádio representa uma fase de preparação para o desenvolvimento reprodutivo ativo (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Morrison, 1987) (Figura 2.5).

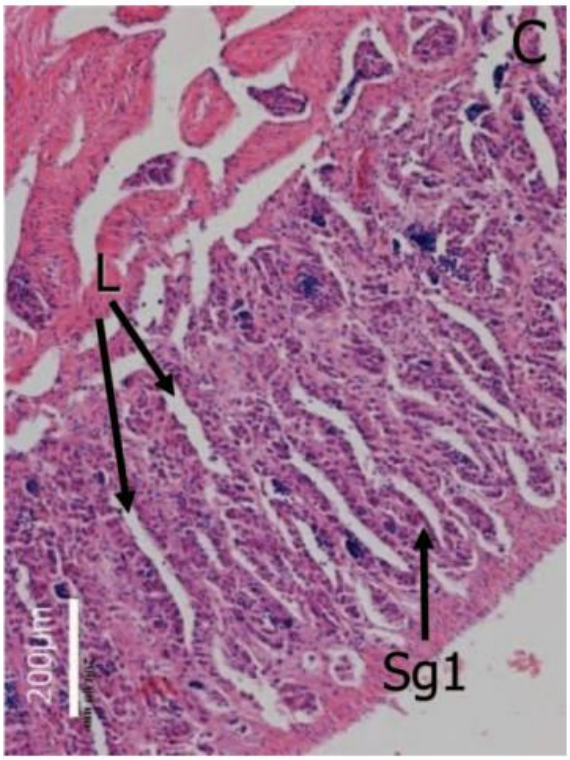

Figura 2.5. Histologia do estádio Regenerando em testículos de teleósteos. Fase regenerante caracterizada pela proliferação espermatogonial no lúmen dos lóbulos (L). Observar o incremento gradual do tamanho gonadal e iniciação de processos de proliferação celular. A vascularização gonadal intensifica-se e a arquitetura tubular torna-se mais organizada. Fonte: (Brown-Peterson *et al.*, 2011).

Estádio Em desenvolvimento: Caracteriza-se pela ativação completa da gametogênese e o crescimento acelerado das gônadas. Os testículos mostram espermatogônias tipo A e B, espermatócitos primários em diversas fases da meiose, e as primeiras espermátides. Os túbulos seminíferos adquirem uma arquitetura complexa com lúmens claramente definidos. Em ovários, observam-se oócitos em crescimento primário e os primeiros oócitos pré-vitelogênicos. A vascularização é intensa e as gônadas atingem tamanhos consideráveis (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Tomkiewicz; Morgan; Saborido-Rey, 2003) (Figura 2.6).

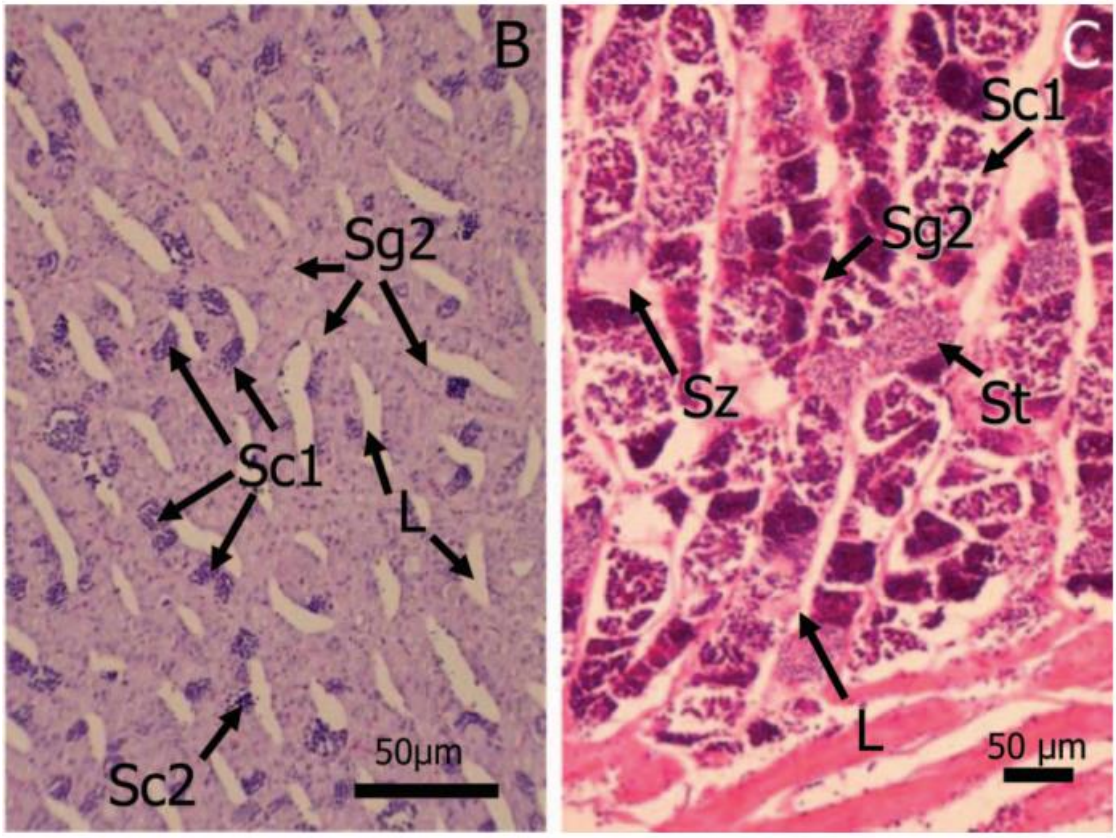

Figura 2.6. Histologia do estádio em desenvolvimento em testículos de teleósteos. (A) Subfase inicial do desenvolvimento mostrando espermatogônias secundárias (Sg2), espermatócitos primários (Sc1) e secundários (Sc2) com lúmen dos lóbulos (L) claramente definido. (B) Fase de desenvolvimento com espermatócitos secundários (Sg2), espermátides (St) e espermatozoides (Sz). Observar a ativação completa da gametogênese com túbulos seminíferos de arquitetura complexa e vascularização intensa. Fonte: (Brown-Peterson *et al.*, 2011).

Estádio Capaz de desovar: Representa a culminação do desenvolvimento reprodutivo com gônadas completamente maduras. Os testículos contêm túbulos seminíferos repletos de espermatozoides maduros e podem liberar gametos com pressão abdominal leve. Os ovários apresentam oócitos vitelogênicos em estádios avançados com núcleos migratórios e folículos hidratados prontos para a ovulação. Este estádio indica a capacidade reprodutiva imediata do indivíduo (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Murua; Saborido-Rey, 2003) (Figura 2.7).

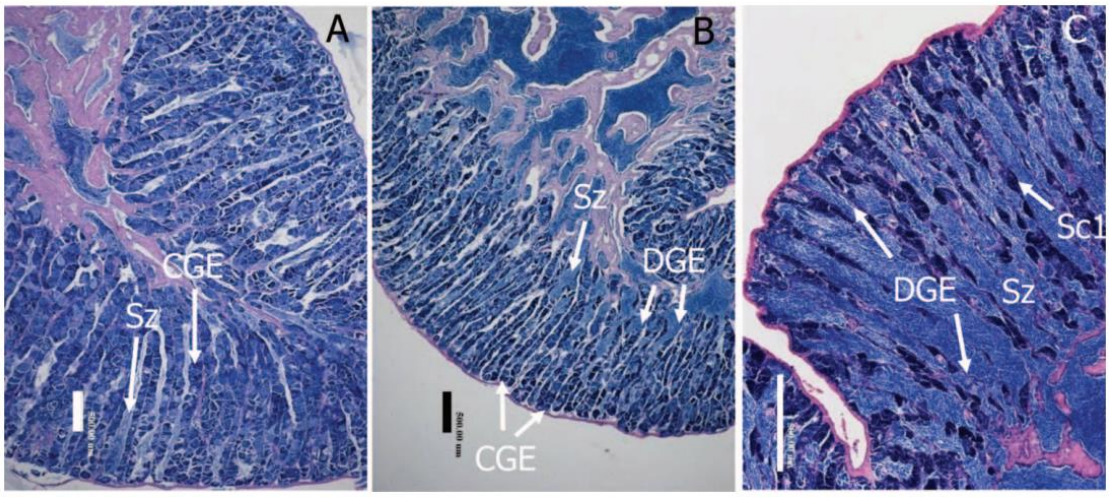

Figura 2.7. Histologia do estádio Capaz de desovar em testículos de teleósteos. (A) Subfase inicial do epitélio germinativo (GE) com túbulos repletos de espermatozoides maduros (Sz). (B) Subfase média do epitélio germinativo. (C) Subfase tardia do epitélio germinativo mostrando espermatócitos primários (Sc1). Culminação do desenvolvimento reprodutivo com gônadas completamente maduras e capacidade reprodutiva imediata. Gametos podem ser liberados com pressão abdominal leve. Escala: 500 µm. Fonte: (Brown-Peterson *et al.*, 2011).

Estádio Regredindo: Corresponde ao período pós-reprodutivo caracterizado pela involução gonadal e a reabsorção de gametos não liberados. Os testículos mostram túbulos seminíferos parcialmente vazios com espermatozoides residuais e evidências de fagocitose por células somáticas. Os ovários apresentam folículos pós-ovulatórios, oócitos atrésicos em diferentes graus de reabsorção, e redução geral do tamanho gonadal. Este estádio precede o reinício do ciclo reprodutivo (Brown-Peterson *et al.*, 2011; Hunter; Macewicz, 2004) (Figura 2.8).

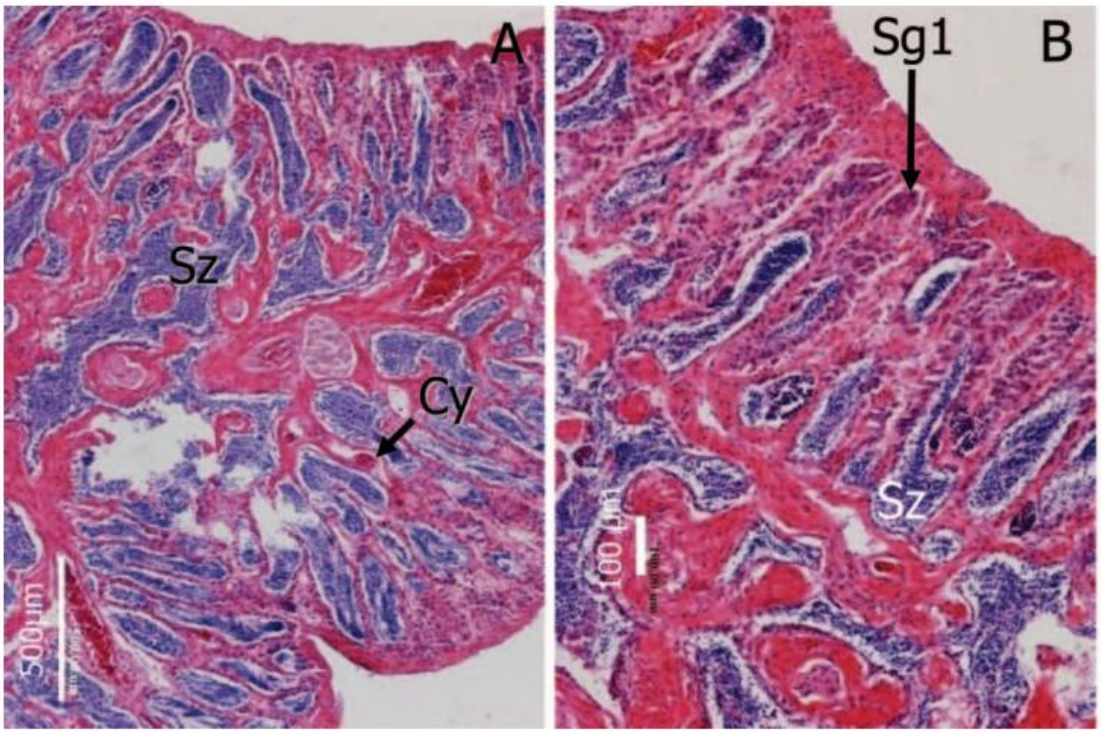

Figura 2.8. Histologia do estádio regredindo em testículos de teleósteos. (A) Fase de regressão mostrando espermatogênese reduzida e espermatozoides residuais (Sz) com espermatocistos (Cy). (B) Fase de regressão evidenciando proliferação espermatogonial na periferia do testículo com espermatogônias primárias (Sg1). Período pós-reprodutivo caracterizado pela involução gonadal e reabsorção de gametos não liberados, precedendo o reinício do ciclo reprodutivo. Fonte: (Brown-Peterson *et al.*, 2011).

A espermatogênese em teleósteos apresenta características únicas que a distinguem de outros vertebrados. Diferentemente dos mamíferos, onde ocorre espermatogênese não cística, os peixes apresentam espermatogênese cística, onde as células germinativas derivadas de uma única espermatogônia tipo A se desenvolvem sincronicamente dentro de estruturas denominadas cistos espermatogênicos, completamente rodeadas por células de Sertoli (Schulz *et al.*, 2010). Esta organização proporciona vantagens evolutivas significativas, incluindo coordenação temporal precisa da diferenciação celular, compartimentalização de fatores regulatórios específicos e otimização da eficiência metabólica durante a gametogênese (Figura 2.9).

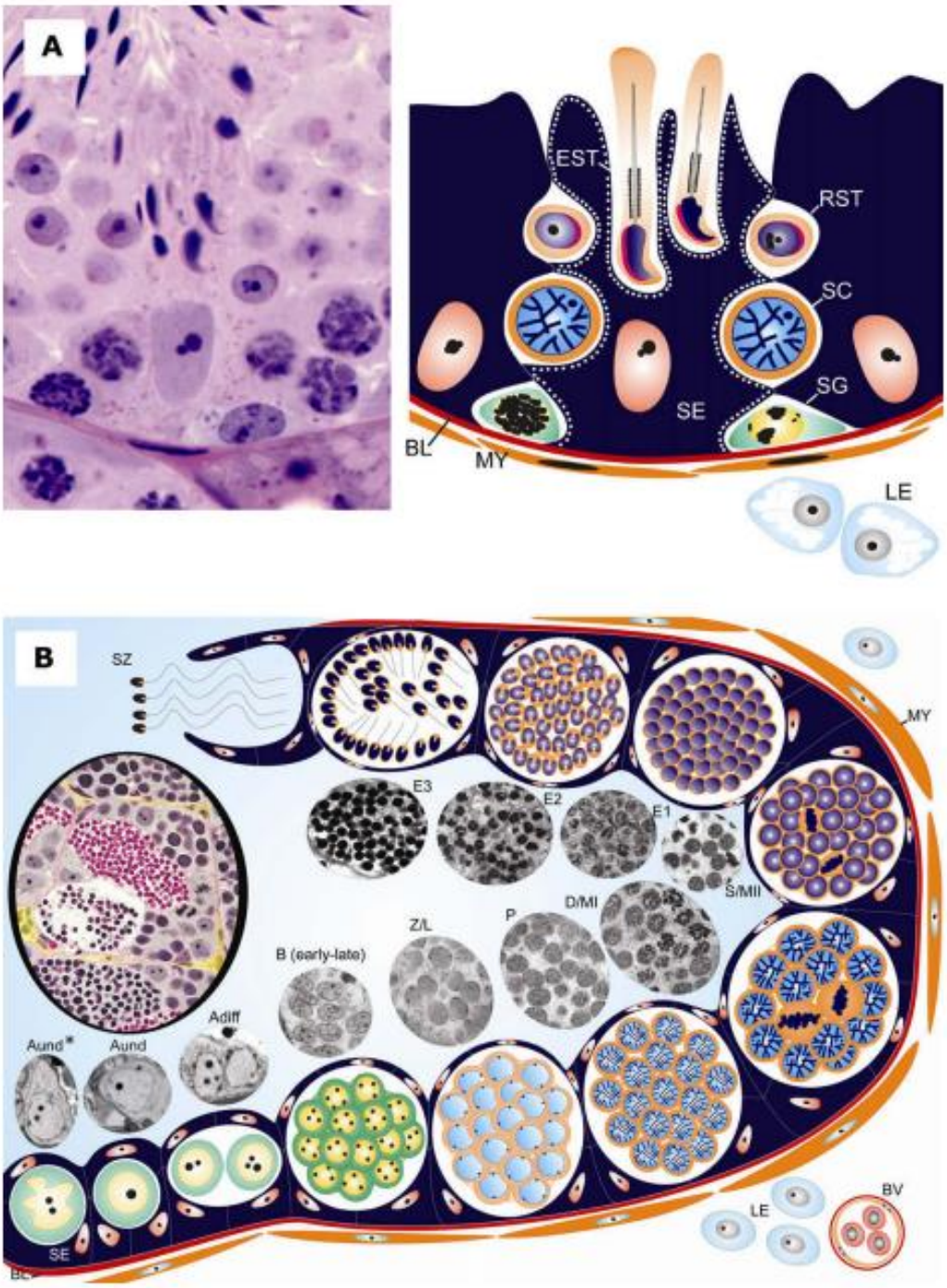

Figura 2.9. Comparação entre espermatogênese não cística (mamíferos) e cística (peixes). (A) Em mamíferos, as células de Sertoli suportam simultaneamente diferentes estádios de células germinativas. (B) Em peixes, cada cisto contém um único clone de células germinativas em desenvolvimento sincrônico rodeado por células de Sertoli especializadas. SE: células de Sertoli; SG: espermatogônias; SC: espermatócitos; SZ: espermatozoides. Adaptado de Schulz *et al.*, (2010).

2.2.3. Arquitetura testicular e organização celular

A organização estrutural dos testículos de teleósteos apresenta duas configurações principais segundo a distribuição de espermatogônias: (1) **distribuição restrita**, onde as espermatogônias indiferenciadas se localizam exclusivamente em regiões distais próximas à túnica albugínea, observando-se migração de cistos em direção aos ductos espermáticos durante a diferenciação; e (2) **distribuição não restrita**, onde as espermatogônias se distribuem uniformemente por todo o compartimento germinal sem migração aparente de cistos (Schulz *et al.*, 2010). O padrão de distribuição não restrita é considerado mais primitivo e se encontra em ordens como *Cypriniformes*, *Characiformes* e *Salmoniformes*, incluindo nossas espécies de estudo *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*.

A arquitetura testicular baseia-se em três compartimentos funcionais distintos: (1) o **compartimento germinal**, onde ocorrem os processos de espermatogênese e é constituído por células germinativas em diferentes estádios de diferenciação organizadas em cistos sincronizados; (2) o **compartimento somático**, formado por células de Sertoli, células intersticiais de Leydig, células mióides peritubulares, e elementos do estroma conjuntivo; e (3) o **compartimento vascular**, que inclui a rede de capilares sanguíneos, vasos linfáticos, e estruturas neurais associadas.

A espermatogênese cística em peixes apresenta duas diferenças principais comparada com vertebrados superiores. Primeiro, dentro dos túbulos espermatogênicos, extensões citoplasmáticas das células de Sertoli formam cistos que envolvem um grupo único, clonal e, portanto, sincronicamente desenvolvido de células germinativas derivadas de uma única espermatogônia. Segundo, as células de Sertoli formadoras de cistos retêm sua capacidade de proliferar também em peixes adultos (Schulz *et al.*, 2010). Assim, a unidade funcional básica do epitélio espermatogênico em peixes é um cisto espermatogênico formado por um grupo dinâmico de células de Sertoli circundando e nutrindo um clone de células germinativas em desenvolvimento sincrônico.

As células de Sertoli císticas concentram fatores de crescimento específicos para cada fase de desenvolvimento, contribuindo para a alta eficiência espermatogênica característica dos teleósteos (conforme detalhado anteriormente) (Schulz *et al.*, 2010).

Células germinativas e organização em cistos

A espermatogênese em teleósteos caracteriza-se por uma organização cistogênica única, onde as células germinativas derivadas de uma espermatogônia tipo A individual permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas e se desenvolvem sincronicamente dentro de estruturas denominadas cistos espermatogênicos (Nóbrega; Batlouni; França, 2009; Schulz *et al.*, 2010). Esta organização proporciona vantagens evolutivas significativas incluindo a coordenação temporal precisa da diferenciação celular, a compartimentalização de fatores regulatórios específicos, e a otimização da eficiência metabólica durante a gametogênese.

Os **cistos espermatogênicos** variam em tamanho desde estruturas microscópicas de 10-15 µm de diâmetro (cistos de espermatogônias) até formações complexas de 100-150 µm (cistos de espermatócitos em paquíteno) que podem conter até 256 células sincronizadas. A progressão desses cistos através dos diferentes compartimentos testiculares segue um padrão espaço-temporal altamente organizado que reflete as fases sequenciais da espermatogênese (Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2010).

Células somáticas de suporte

As **células de Sertoli** em teleósteos apresentam características morfológicas e funcionais distintivas que refletem seu papel central na regulação da espermatogênese. Essas células, caracterizadas por núcleos irregulares com nucléolos proeminentes e citoplasma rico em retículo endoplasmático liso, estabelecem junções aderentes complexas com as células germinativas e secretam uma variedade de fatores tróficos, hormônios esteroides, e proteínas estruturais essenciais para a manutenção do microambiente espermatogênico (Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2010).

As **células de Leydig**, localizadas no interstício testicular entre os túbulos seminíferos, constituem a fonte principal de andrógenos testiculares, particularmente 11-cetotestosterona (11-KT), o andrógeno mais potente em peixes. Essas células apresentam características ultraestruturais típicas de células esteroidogênicas, incluindo mitocôndrias com cristas tubulares, retículo endoplasmático liso abundante, e grânulos lipídicos ricos em precursores esteroidogênicos (Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2010).

Uma característica notável das **células de Sertoli** em peixes é sua capacidade proliferativa contínua durante a vida adulta, contrastando com mamíferos onde cessam a proliferação na puberdade. Na espermatogênese cística, o número de células de Sertoli por cisto aumenta de maneira previsível conforme o cisto se desenvolve, principalmente durante a fase de expansão mitótica de espermatogônias. Esta proliferação é especialmente intensa em cistos espermatogoniais, coincidindo com o período de maior crescimento do cisto (Schulz *et al.*, 2010). A formação de junções oclusivas entre células de Sertoli vizinhas ocorre ao final da meiose/início da espermiogênese, estabelecendo um espaço privilegiado para as células germinativas meióticas e pós-meióticas tardias.

2.2.4. Regulação hormonal da espermatogênese

A espermatogênese em teleósteos está regulada por um sistema endócrino complexo que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) e múltiplos fatores parácrinos e autócrinos que atuam a nível testicular local (Levavi-Sivan *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2010). Este sistema regulatório apresenta características únicas que refletem as adaptações evolutivas específicas dos peixes a ambientes aquáticos variáveis.

Regulação central: O eixo HPG

O hipotálamo secreta hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) em múltiplas formas isoméricas (GnRH1, GnRH2, GnRH3) que apresentam padrões de expressão tecido-específicos e funções regulatórias diferenciadas. GnRH1, expressa principalmente na área pré-óptica, constitui a forma

hipofisiotrópica principal que regula a síntese e liberação de gonadotropinas hipofisárias (Levavi-Sivan *et al.*, 2010; Zohar *et al.*, 2010).

A hipófise anterior secreta duas gonadotropinas glicoproteicas: o **hormônio folículo estimulante** (FSH) e o **hormônio luteinizante** (LH), que apresentam funções específicas e complementares na regulação da espermatogênese. FSH, expressa constitutivamente durante todo o ciclo reprodutivo, regula as fases iniciais da espermatogênese incluindo a proliferação de espermatogônias, a entrada em meiose, e a síntese de fatores tróficos por células de Sertoli (García-López *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2010).

LH apresenta um padrão de expressão mais restrito temporalmente, com picos de concentração durante as fases finais da espermatogênese e a maturação espermática. Este hormônio regula a síntese de andrógenos por células de Leydig, a maturação final de espermatozoides, e os processos de espermiação (Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2010).

Regulação local: Fatores parácrinos e autócrinos

A nível testicular, múltiplos fatores locais modulam a resposta às gonadotropinas e regulam aspectos específicos da espermatogênese. Os **andrógenos**, particularmente a 11-cetotestosterona (11-KT), atuam como reguladores centrais da proliferação espermatogonial, a progressão meiótica, e a diferenciação espermática final (Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2010).

Os **estrógenos**, sintetizados localmente pela aromatização de andrógenos, desempenham funções regulatórias inesperadas em testículos de peixes, incluindo a modulação da renovação de células-tronco espermatogoniais e a regulação de fatores de crescimento específicos (Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2010).

Fatores de crescimento como IGF-1 (fator de crescimento similar à insulina-1), activinas, inibinas, e fatores da família TGF-β regulam aspectos específicos da proliferação e diferenciação de células germinativas, estabelecendo circuitos regulatórios complexos que permitem o ajuste fino da espermatogênese a condições ambientais variáveis (Rolland *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

2.2.5. Fases da espermatogênese: De espermatogônias a espermatozoides

A espermatogênese em teleósteos divide-se conceitualmente em três fases principais: (1) **fase mitótica** ou espermatogonial, (2) **fase meiótica** ou espermatocítica, e (3) **fase de diferenciação** ou espermiogênese. Cada fase apresenta características celulares, moleculares e regulatórias distintivas que refletem os processos específicos de proliferação, recombinação genética, e diferenciação morfológica (Nóbrega; Batlouni; França, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

Fase mitótica: Expansão do pool de células germinativas

A fase mitótica inicia-se com a ativação de espermatogônias tipo A indiferenciadas (Aund), que constituem a população de células-tronco espermatogoniais responsáveis pela manutenção da capacidade regenerativa testicular ao longo da vida reprodutiva. Essas células, caracterizadas por núcleos ovais com cromatina finamente dispersa e nucléolos proeminentes, apresentam características de células-tronco incluindo capacidade de autorrenovação, potencial de diferenciação multipotente, e resistência a fatores de estresse (Nóbrega; Batlouni; França, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

Reconhecem-se diferentes tipos de espermatogônias tipo A indiferenciadas (Aund), incluindo uma população mais primitiva (Aund*) que poderia representar as verdadeiras células-tronco, caracterizada por núcleos menores, menor heterocromatina, membrana nuclear mais convoluta, maior número de mitocôndrias e abundante material eletrodenso denominado 'nuage' (Schulz *et al.*, 2010). Este material 'nuage', composto por ribonucleoproteínas e mRNAs de longa vida média incluindo *vasa*, é característico de células germinativas primordiais e constitui um dos marcadores celulares mais específicos para identificar células com potencial de células-tronco. A progressão das diferentes gerações espermatogoniais pode ser visualizada na (Figura 2.10).

As espermatogônias Aund diferenciam-se em **espermatogônias tipo A diferenciadas** (Adiff) que iniciam um programa de proliferação determinística caracterizado por ciclos de divisão mitótica sincronizados. Esses ciclos produzem gerações sucessivas de células que permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas, formando clones celulares sincronizados que constituem a base da organização cística (Miura *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2010)

A progressão desde espermatogônias Adiff para **espermatogônias tipo B** marca a transição para o compromisso meiótico irreversível. As espermatogônias B apresentam características morfológicas distintivas incluindo núcleos esféricos com cromatina mais condensada e uma redução gradual na capacidade proliferativa (Nóbrega; Batlouni; França, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

Fase meiótica: Recombinação genética e redução cromossômica

A entrada em meiose representa um ponto de controle crítico regulado por múltiplos fatores incluindo o ácido retinóico, fatores de transcrição específicos (como STRA8), e sinais parácrinos derivados de células somáticas. Os **espermatócitos primários** experimentam a prófase meiótica prolongada caracterizada por fases sequenciais de pareamento cromossômico (leptóteno, zigóteno), recombinação genética (paquíteno), e resolução de quiasmas (diplóteno, diacinese) (Schulz *et al.*, 2010; Wallace; Selman, 1981).

O **paquíteno** representa a fase mais prolongada da meiose masculina, estendendo-se por períodos de 7-14 dias dependendo da espécie e da temperatura. Durante esta fase, os cromossomos homólogos permanecem pareados mediante complexos sinaptonêmicos e ocorrem os eventos de recombinação genética que geram a diversidade genética dos gametos (Schulz *et al.*, 2010; Wallace; Selman, 1981).

A **primeira divisão meiótica** produz espermatócitos secundários haplóides que rapidamente progridem através da segunda divisão meiótica para gerar espermátides haplóides. Esta transição é particularmente vulnerável a fatores de estresse ambientais e representa um ponto de controle de qualidade para a eliminação de células com dano genético (Schulz *et al.*, 2010).

Espermiogênese: Diferenciação morfológica especializada

A espermiogênese representa a fase final da espermatogênese caracterizada pela transformação dramática de espermátides esféricas em espermatozoides altamente especializados mediante processos complexos de reorganização celular, síntese de proteínas específicas, e morfogênese dirigida (Mattei; Xavier, 1991; Schulz *et al.*, 2010).

Os eventos principais da espermiogênese incluem: (1) a **formação do acrossomo** mediante a fusão de vesículas do aparelho de Golgi que contêm enzimas hidrolíticas específicas; (2) o **desenvolvimento do flagelo** a partir da reorganização do centríolo distal e a polimerização de microtúbulos axonemais; (3) a **elongação nuclear** com condensação extrema da cromatina mediada por protaminas específicas de peixes; e (4) a **reorganização mitocondrial** com a formação da bainha mitocondrial que proporciona a energia ATP necessária para a motilidade espermática (Lahnsteiner *et al.*, 1995; Mattei; Xavier, 1991).

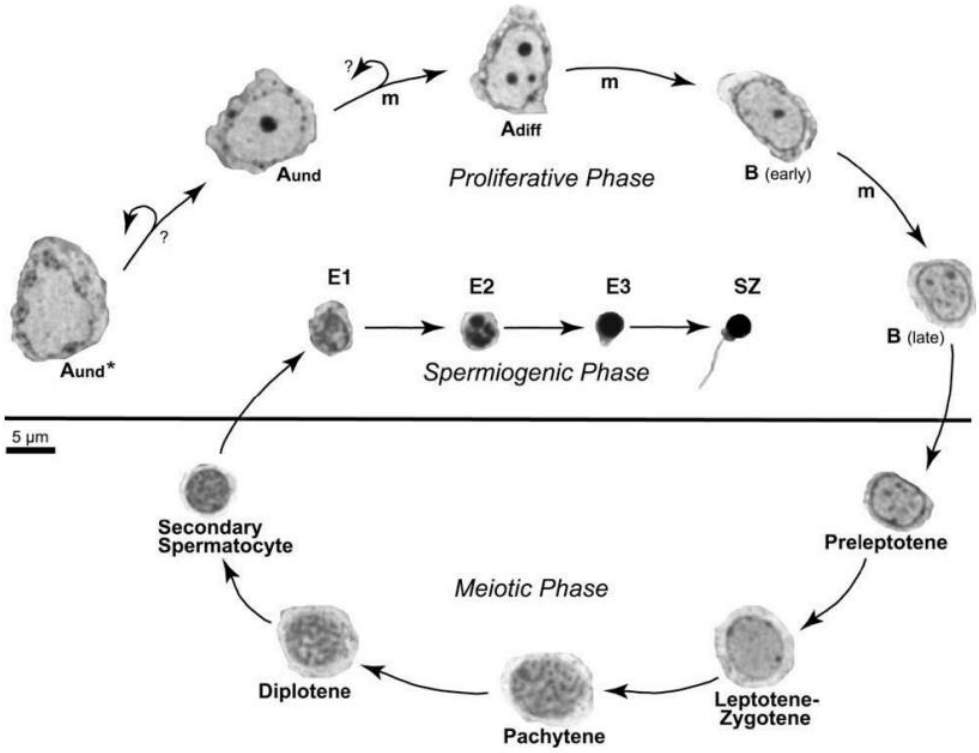

Figura 2.10. Gerações espermatogoniais em peixes teleósteos. Progressão desde espermatogônias tipo A indiferenciadas (Aund*) até espermatozoides, mostrando as três fases principais: proliferativa, meiótica e espermiogênica. As setas curvas indicam auto-renovação, as setas simples indicam mitose. Observar o material 'nuage' característico em Aund*. Escala: 5 µm. Adaptado de Schulz *et al.*, (2010).

2.3. O gene *vasa*: Arquiteto molecular da linhagem germinal

2.3.1. Descobrimento histórico e significado evolutivo

A identificação do gene *vasa* em *Drosophila melanogaster* por Hay e colaboradores em 1988 marcou um marco revolucionário em nossa compreensão dos mecanismos moleculares que governam a especificação e desenvolvimento de células germinativas. Essa descoberta, inicialmente motivada pela busca de genes maternos essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial, revelou a existência de um sistema de determinantes moleculares altamente conservado que transcende as barreiras taxonômicas e

estabelece a identidade germinativa desde as etapas mais iniciais do desenvolvimento (Hay; Jan; Jan, 1988; Lasko; Ashburner, 1988).

A denominação "*vasa*" deriva do latim e faz referência a "vaso" ou "recipiente", uma metáfora apropriada que reflete sua função como componente integral de estruturas citoplasmáticas especializadas (grânulos polares, grânulos germinais) que atuam como "recipientes" de determinantes germinativos essenciais. Esta nomenclatura, adotada universalmente pela comunidade científica, simboliza a função conservadora e organizadora desta proteína no estabelecimento e manutenção da identidade celular germinativa (Extavour; Akam, 2003; Raz, 2000).

Conservação evolutiva excepcional

As análises filogenéticas comparativas revelaram que o gene *vasa* apresenta um grau de conservação evolutiva excepcional que supera inclusive o de genes housekeeping fundamentais como a actina e a tubulina. Esta conservação estende-se não apenas a nível de sequência nucleotídica e aminoacídica, mas também a nível de organização estrutural, padrões de expressão espaço-temporal, e função molecular, sugerindo pressões seletivas extraordinariamente intensas para a manutenção da integridade funcional deste sistema (Matsuyama *et al.*, 2015; Mochizuki; Nishimiya-Fujisawa; Fujisawa, 2001).

A identificação de ortólogos de *vasa* em praticamente todos os filos animais estudados, desde cnidários até vertebrados superiores, com identidades de sequência que frequentemente superam os 70% a nível proteico, constitui um dos exemplos mais notáveis de conservação evolutiva em biologia molecular do desenvolvimento. Esta conservação universal sugere que os mecanismos fundamentais de especificação de células germinativas foram estabelecidos muito cedo na evolução animal e foram mantidos com modificações mínimas ao longo de mais de 600 milhões de anos de evolução (Ewen-Campen; Schwager; Extavour, 2010; Extavour; Akam, 2003).

2.3.2. Estrutura genômica e organização molecular

Arquitetura genômica complexa

O gene *vasa* de teleósteos apresenta uma arquitetura genômica caracterizada por uma complexidade estrutural notável que reflete a sofisticação de seus mecanismos regulatórios. O gene tipicamente estende-se por 8-12 kb de DNA genômico e contém 20-24 éxons separados por íntrons de tamanho variável, uma organização que contrasta marcadamente com a estrutura mais simples de genes ortólogos em invertebrados (Li *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2019).

O primeiro éxon, que contém a região 5' não traduzida (5'UTR) e os primeiros códons da sequência codificante, apresenta características únicas incluindo elementos regulatórios em cis que medeiam a resposta a fatores de transcrição específicos de células germinativas. Os éxons 2-8 codificam a região N-terminal rica em glicina e os motivos de união a RNA, enquanto os éxons 9-16 contêm as sequências que codificam os domínios helicasa conservados. Os éxons finais (17-24) incluem a região C-terminal e a 3'UTR extensa que contém elementos regulatórios pós-transcricionais críticos (Krøvel; Olsen, 2004; Li *et al.*, 2013).

Elementos regulatórios em cis

A região promotora do gene *vasa* apresenta uma organização modular complexa que inclui múltiplos elementos regulatórios em cis responsáveis pela especificidade de expressão em células germinativas. As análises de deleção funcional e ensaios de gene repórter identificaram pelo menos cinco elementos regulatórios distintos: (1) **elementos proximais** (-200 a -50 pb do sítio de início de transcrição) que contêm caixas TATA atípicas e sítios de união para fatores de transcrição básicos; (2) **elementos de especificidade germinal** (-500 a -200 pb) que incluem sítios de reconhecimento para fatores específicos como Oct4, Nanog, e Sox2; (3) **enhancers distais** (-2000 a -500 pb) que respondem a sinais de diferenciação celular; (4) **elementos de silenciamento somático** que previnem a expressão ectópica em células não germinativas; e (5) **sequências de resposta hormonal** que medeiam a modulação da expressão em resposta a esteroides gonadais (Li *et al.*, 2013; Yoshizaki *et al.*, 2000).

Splicing alternativo e diversidade de isoformas

Uma característica fundamental do gene *vasa* em vertebrados é sua capacidade para gerar múltiplas isoformas proteicas mediante mecanismos de splicing alternativo que proporcionam um nível adicional de regulação funcional. Em *Danio rerio*, o gene *vasa* produz pelo menos quatro isoformas principais denominadas *vasa-a*, *vasa-b*, *vasa-l*, e *vasa-Δ4*, que diferem na inclusão/exclusão de éxons específicos e na utilização de sítios alternativos de splicing (Hartung; Forbes; Marlow, 2014; Krøvel; Olsen, 2004).

A isoforma *vasa-l* (longa) inclui todos os éxons e codifica a proteína *VASA* completa de 661 aminoácidos com todos os domínios funcionais intactos. A isoforma *vasa-Δ4* carece do éxon 4, resultando numa proteína truncada que mantém a atividade helicasa mas apresenta propriedades alteradas de união a RNA. As isoformas *vasa-a* e *vasa-b* representam variantes de splicing que utilizam sítios alternativos de poliadenilação, gerando proteínas com regiões C-terminais modificadas (Krøvel; Olsen, 2004).

O **dimorfismo sexual na expressão de isoformas** constitui uma característica notável do gene *vasa* em muitas espécies de teleósteos. No peixe-zebra, a isoforma *vasa-l* apresenta níveis de expressão 3-5 vezes superiores em ovários comparados com testículos durante o desenvolvimento gonadal, enquanto *vasa-Δ4* mostra padrões de expressão mais uniformes entre sexos. Este dimorfismo sugere funções especializadas de diferentes isoformas na gametogênese masculina versus feminina (Huang *et al.*, 2014; Krøvel; Olsen, 2004).

2.3.3. Estrutura e domínios funcionais da proteína *VASA*

Domínios estruturais conservados

A proteína *VASA* apresenta uma arquitetura modular altamente conservada caracterizada pela presença de domínios funcionais específicos que refletem sua função como RNA helicasa especializada em células germinativas. A proteína madura tipicamente contém 600-700 aminoácidos organizados em regiões funcionalmente distintas que incluem um domínio N-terminal rico em

glicina, domínios helicasa centrais conservados, e uma região C-terminal com funções regulatórias específicas (Linder *et al.*, 1989; Sengoku *et al.*, 2006).

O **domínio N-terminal** (aminoácidos 1-180) apresenta características únicas que o distinguem de outras RNA helicasas. Esta região contém múltiplas repetições de dipéptidos arginina-glicina (RG) e tripéptidos arginina-glicina-glicina (RGG) que formam domínios de união a RNA de baixa especificidade. No tambaqui, esta região contém seis repetições RG e dez repetições RGG, representando aproximadamente 35% do conteúdo total de aminoácidos nos primeiros 169 resíduos (Hay; Jan; Jan, 1988; Vasconcelos *et al.*, 2019).

Os **domínios helicasa centrais** (aminoácidos 180-500) contêm os motivos conservados característicos da família DEAD-box, incluindo: (1) **motivo ATP-A** (AXXXXGKT) responsável pela união específica de ATP; (2) **motivo DEAD** (Asp-Glu-Ala-Asp) que medeia a hidrólise de ATP; (3) **motivo SAT** que participa no desenrolamento de RNA; (4) **motivo HRIGR** essencial para a união específica a substratos de RNA; e (5) **motivos Q** que regulam a atividade ATPásica em resposta à união de RNA (Pause; Sonenberg, 1992; Tanner *et al.*, 2003).

O **domínio C-terminal** (aminoácidos 500-660) contém regiões de interação proteína-proteína que medeiam a formação de complexos macromoleculares e a localização subcelular específica. Esta região inclui sítios de união para cofatores específicos, sequências de localização nuclear (NLS) e citoplasmática, e domínios de interação com componentes do citoesqueleto (Linder *et al.*, 1989; Sengoku *et al.*, 2006).

Características bioquímicas e propriedades enzimáticas

A proteína *VASA* apresenta propriedades bioquímicas distintivas que refletem sua especialização funcional em células germinativas. A atividade RNA helicasa opera de maneira direcional 5'→3' com uma eficiência catalítica (kcat/KM) de aproximadamente $2,8 \times 10^6$ $M^{-1}s^{-1}$ para substratos de RNA de dupla cadeia, valores que a posicionam entre as RNA helicasas mais eficientes caracterizadas (Jankowsky *et al.*, 2001; Sengoku *et al.*, 2006).

A **especificidade de substrato** apresenta características únicas que distinguem *VASA* de outras helicasas DEAD-box. A proteína mostra preferência por substratos de RNA com estruturas secundárias complexas, particularmente elementos em forma de grampo (hairpins) com alças ricas em AU e hastes de longitude intermediária (10-20 pares de bases). Esta especificidade está mediada por interações cooperativas entre os domínios de união a RNA N-terminais e os domínios helicasa centrais (Linder *et al.*, 1989; Sengoku *et al.*, 2006).

Modificações pós-traducionais

A proteína *VASA* está sujeita a múltiplas modificações pós-traducionais que regulam sua atividade enzimática, localização subcelular, e interações proteicas. As **fosforilações** constituem o mecanismo regulatório principal, com pelo menos 12 sítios de fosforilação identificados em resíduos de serina, treonina, e tirosina distribuídos ao longo da sequência proteica (Carrera *et al.*, 2000; Megosh *et al.*, 2006).

A fosforilação de resíduos específicos no domínio N-terminal (Ser38, Ser60, Ser78) modula a afinidade de união a RNA e regula a formação de grânulos ribonucleoprotéicos. As fosforilações no domínio helicasa central (Thr265, Ser291) afetam a atividade ATPásica e a eficiência de desenrolamento de RNA, enquanto as modificações no domínio C-terminal (Ser542, Tyr598) regulam as interações proteína-proteína e a localização subcelular (Megosh *et al.*, 2006; Thomson *et al.*, 2008).

2.3.4. Função molecular e mecanismos de ação

Atividade RNA helicasa: Mecanismos catalíticos

A função primária da proteína *VASA* como RNA helicasa especializada envolve o desenoveamento de estruturas secundárias de RNA mediante um mecanismo catalítico complexo que requer a coordenação da união de ATP, a interação com substratos de RNA, e mudanças conformacionais específicas que resultam na separação de cadeias complementares (Jankowsky *et al.*, 2001; Sengoku *et al.*, 2006).

O **ciclo catalítico** inicia-se com a união de ATP ao domínio helicasa, induzindo uma mudança conformacional que incrementa a afinidade por substratos de RNA de dupla cadeia. A união do substrato provoca a ativação da atividade ATPásica, resultando na hidrólise de ATP e a liberação de ADP + Pi. A energia liberada impulsiona uma mudança conformacional adicional que desestabiliza as interações Watson-Crick no substrato de RNA, promovendo a separação das cadeias complementares (Jankowsky *et al.*, 2001; Linder, 2006).

A **direcionalidade 5'→3'** da atividade helicasa está determinada por interações específicas entre os domínios de união a RNA e a orientação do substrato. Estudos cristalográficos revelaram que a proteína *VASA* une-se preferencialmente ao extremo 5' de uma das cadeias de RNA, utilizando esta interação como ponto de ancoragem para o processo de desenrolamento direcional (Andersen *et al.*, 2006; Sengoku *et al.*, 2006).

Regulação da tradução: Controle temporal e espacial

Em células germinativas, a proteína *VASA* desempenha funções regulatórias críticas no controle da tradução de mRNAs específicos, atuando como um interruptor molecular que determina quando e onde se sintetizam proteínas particulares durante o (Johnstone; Lasko, 2001; Styhler *et al.*, 1998).

O **mecanismo de repressão traduccional** envolve a formação de complexos ribonucleoprotéicos (RNPs) que sequestram mRNAs específicos em estruturas citoplasmáticas especializadas onde permanecem em estado translationally silenced até receber sinais de ativação apropriados. *VASA* facilita a formação desses complexos mediante sua atividade helicasa, que promove a remodelação de estruturas de RNA e facilita o recrutamento de fatores repressores específicos (Nakamura *et al.*, 2001; Styhler *et al.*, 1998).

A **ativação traduccional** ocorre mediante a disrupção dos complexos repressores em resposta a sinais específicos de desenvolvimento ou diferenciação. *VASA* catalisa a liberação de mRNAs dos grânulos de armazenamento e promove seu recrutamento ao aparato tradutor mediante interações com fatores de iniciação da tradução e componentes ribossomais (Carrera *et al.*, 2000; Johnstone; Lasko, 2001).

Organização de grânulos germinativos

Os **grânulos germinativos** representam estruturas citoplasmáticas altamente especializadas que contêm concentrações elevadas de mRNAs específicos, proteínas regulatórias, e componentes do aparato tradutor em estado de atividade reduzida. *VASA* constitui um componente estrutural essencial desses grânulos, onde atua como uma proteína scaffold que organiza a arquitetura macromolecular e regula a dinâmica de ensamblagem/desensamblagem (Updike; Strome, 2010; Voronina *et al.*, 2011).

A **formação de grânulos** é um processo altamente regulado que envolve a oligomerização de *VASA* mediante interações proteína-proteína específicas mediadas pelos domínios N-terminal e C-terminal. Esta oligomerização cria uma matriz tridimensional que pode recrutar seletivamente mRNAs específicos baseando-se em elementos de sequência presentes em suas regiões 5' e 3' não traduzidas (Little *et al.*, 2015; Voronina *et al.*, 2011).

A espermatogênese em teleósteos apresenta características únicas que a distinguem de outros vertebrados, particularmente a organização cística onde células germinativas desenvolvem-se sincronicamente dentro de cistos rodeados por células de Sertoli, resultando em maior eficiência com apenas 30% de perda apoptótica comparado com 60-80% em mamíferos (Schulz *et al.*, 2010).

2.3.5. Regulação da expressão do gene *vasa*

Controle transcricional: Mecanismos moleculares

A regulação transcricional do gene *vasa* representa um dos sistemas de controle gênico mais sofisticados em biologia do desenvolvimento, caracterizado por múltiplos níveis de regulação que incluem fatores de transcrição específicos, modificações epigenéticas, e elementos regulatórios em cis que atuam de maneira coordenada para estabelecer e manter padrões de expressão altamente específicos em células germinativas (Gustafson; Wessel, 2010; Li *et al.*, 2013).

Fatores de transcrição específicos

Os **fatores de pluripotência** incluindo Oct4, Nanog, e Sox2 desempenham papéis centrais na ativação transcricional do gene *vasa* durante as etapas iniciais do desenvolvimento de células germinativas. Oct4 une-se a elementos regulatórios específicos na região promotora (-480 a -465 pb) através de seu domínio de união a DNA tipo POU, ativando a transcrição mediante o recrutamento de coativadores transcricionais como p300 e CBP (Kehler *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2013).

Nanog atua sinergicamente com Oct4 mediante a união a sequências palindrômicas conservadas (-320 a -295 pb) e o estabelecimento de alças de cromatina que facilitam as interações entre elementos regulatórios distais e o promotor proximal. Esta cooperação é essencial para a manutenção de níveis altos de expressão durante a migração de células germinativas primordiais (Chambers *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009).

Regulação epigenética

As **modificações de histonas** proporcionam um nível adicional de regulação que determina a acessibilidade da cromatina a fatores de transcrição e a maquinaria transcricional. O promotor do gene *vasa* em células germinativas ativas apresenta um padrão característico de marcas epigenéticas ativadoras incluindo H3K4me3 (trimetilação de lisina 4 na histona H3) na região do promotor proximal, H3K27ac (acetilação de lisina 27) em elementos enhancer, e H3K36me3 no corpo do gene (Lesch *et al.*, 2013; Sachs *et al.*, 2013).

A **metilação do DNA** atua como um mecanismo repressor em células somáticas, onde ilhas CpG na região promotora do gene *vasa* apresentam níveis de metilação de 85-95% que correlacionam com a ausência de expressão. Em células germinativas, essas mesmas regiões mostram níveis de metilação reduzidos (5-15%) que permitem a união de fatores de transcrição e a ativação gênica (Hackett *et al.*, 2013; Seisenberger *et al.*, 2012).

Controle pós-transcricional: microRNAs e elementos regulatórios na 3'UTR

A região 3'UTR do mRNA de *vasa* contém múltiplos elementos regulatórios que medeiam o controle pós-transcricional da expressão gênica mediante interações com microRNAs específicos, proteínas de união a RNA, e fatores que regulam a estabilidade do mRNA (Kedde *et al.*, 2007; Mishima *et al.*, 2006).

MicroRNAs regulatórios específicos

No peixe-zebra, miR-430 regula a expressão de *vasa* durante transições críticas do desenvolvimento mediante a união a sítios específicos na 3'UTR (posições 1247-1253 e 1891-1897) que apresentam complementaridade perfeita com a região seed do microRNA. Esta regulação é particularmente importante durante a transição materno-zigótica, onde miR-430 facilita a degradação de mRNAs maternos de *vasa* e permite a transição para a expressão zigótica (Giraldez *et al.*, 2006; Mishima *et al.*, 2006).

Proteínas de união a RNA

Múltiplas proteínas de união a RNA reconhecem elementos específicos na 3'UTR de *vasa* e modulam a estabilidade do mRNA, a eficiência traduccional, e a localização subcelular. Pumilio (PUM) une-se a elementos ricos em AU (posições 987-1002) e recruta fatores de deadenilação que promovem a degradação do mRNA em contextos celulares específicos (Kedde *et al.*, 2007; Miller; Olivas, 2011).

DAZL (Deleted in Azoospermia-Like) interage com motivos GUU repetidos (posições 1456-1489) e atua como um ativador traduccional que promove o recrutamento de ribossomos e incrementa a síntese proteica em células germinativas diferenciadas (Chen *et al.*, 2014; Reynolds *et al.*, 2005).

2.3.6. Expressão do gene *vasa* durante o desenvolvimento gonadal

Padrões temporais de expressão: Ontogenia e gametogênese

A expressão do gene *vasa* durante o desenvolvimento gonadal apresenta padrões dinâmicos e altamente regulados que refletem os processos

complexos de especificação, migração, proliferação, e diferenciação de células germinativas ao longo da ontogenia (Extavour; Akam, 2003; Knaut *et al.*, 2000). Esses padrões foram caracterizados em múltiplas espécies de teleósteos utilizando técnicas que incluem hibridação in situ, RT-PCR quantitativa, e imunohistoquímica, revelando uma conservação notável dos mecanismos regulatórios fundamentais (Vasconcelos *et al.*, 2019; Xu; Gui; Hong, 2005).

Expressão durante o desenvolvimento embrionário inicial

Durante as etapas mais iniciais do desenvolvimento embrionário, a expressão de *vasa* inicia-se com a herança materna de mRNAs e proteínas acumulados no citoplasma cortical de ovócitos maduros. Esses produtos maternos distribuem-se assimetricamente durante as primeiras divisões de segmentação, concentrando-se em blastômeros específicos que darão origem a células germinativas primordiais (PGCs) (Knaut *et al.*, 2000; Yoon; Kawakami; Hopkins, 1997).

Em *Danio rerio*, os transcritos maternos de *vasa* são detectáveis desde os estádios de 1-célula até as 3 horas pós-fertilização (hpf), quando começa a transcrição zigótica do gene. A proteína *VASA* materna localiza-se inicialmente em grânulos citoplasmáticos dispersos que gradualmente se agregam em estruturas maiores durante as divisões de segmentação (Braat *et al.*, 1999; Knaut *et al.*, 2000).

Especificação e migração de células germinativas primordiais

A transição desde a expressão materna para a expressão zigótica de *vasa* ocorre durante o período de ativação do genoma zigótico (6-8 hpf em espécies tropicais). Durante esta fase, aproximadamente 20-30 células na região marginal ventral do embrião começam a expressar altos níveis de *vasa* e adquirem características morfológicas distintivas de PGCs, incluindo citoplasma basófilo, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, e a presença de grânulos germinativos (Raz, 2003; Yoon; Kawakami; Hopkins, 1997).

A migração de PGCs para as cristas genitais está acompanhada pela manutenção de altos níveis de expressão de *vasa*, que atua tanto como

marcador de identidade germinativa quanto regulador funcional de processos celulares específicos incluindo motilidade dirigida, sobrevivência celular, e resistência a sinais apoptóticos (Raz, 2003; Weidinger *et al.*, 2003).

Expressão durante o desenvolvimento gonadal

Uma vez estabelecidas nas cristas genitais, as células germinativas mantêm a expressão de *vasa* através das fases de diferenciação sexual e desenvolvimento gonadal, embora com variações quantitativas significativas que correlacionam com estádios específicos de desenvolvimento e tipos celulares particulares (Raghuveer; Senthilkumaran, 2010; Xu; Gui; Hong, 2005).

Em **testículos em desenvolvimento**, os níveis mais altos de expressão de *vasa* observam-se em espermatogônias tipo A indiferenciadas, que representam a população de células-tronco espermatogoniais. A expressão diminui progressivamente durante a diferenciação para espermatogônias tipo B, espermatócitos, e é praticamente indetectável em espermátides e espermatozoides maduros (Xu; Gui; Hong, 2005; Zhao *et al.*, 2018).

Em **ovários em desenvolvimento**, *vasa* expressa-se intensamente em oogônias e ovócitos em crescimento primário, com níveis que variam segundo o estádio de foliculogênese. A expressão é particularmente alta em ovócitos pré-vitelogênicos e diminui durante a vitelogênese avançada (Xu; Gui; Hong, 2005; Yu *et al.*, 2015).

Dimorfismo sexual na expressão

Uma característica notável da expressão de *vasa* em teleósteos é a presença de dimorfismo sexual tanto nos níveis de expressão quanto nos padrões de isoformas específicas. Em *D. rerio*, a isoforma *vasa-l* apresenta níveis 3-5 vezes superiores em ovários comparados com testículos durante estádios específicos do desenvolvimento gonadal, enquanto a isoforma *vasa-Δ4* mostra padrões mais uniformes entre sexos (Krøvel; Olsen, 2004).

Este dimorfismo sexual reflete diferenças fundamentais nos programas de desenvolvimento entre gametogênese masculina e feminina, incluindo diferenças na duração das fases de desenvolvimento, os mecanismos de

controle de qualidade, e os requerimentos energéticos específicos de cada processo (Huang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

2.4. Técnicas moleculares para o estudo da expressão gênica

2.4.1. PCR quantitativa em tempo real (qPCR): Fundamentos e aplicações

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) representa a técnica padrão ouro para a quantificação precisa de níveis de expressão gênica, proporcionando sensibilidade, especificidade, e reprodutibilidade superiores a métodos alternativos (Derveaux; Vandesompele; Hellemans, 2010). Esta tecnologia revolucionou o estudo da expressão de *vasa* em células germinativas ao permitir a detecção e quantificação de transcritos específicos em amostras de tamanho limitado com precisão e exatidão excepcionais.

Princípios técnicos fundamentais

A qPCR baseia-se na amplificação exponencial de sequências específicas de DNA complementar (cDNA) mediante ciclos repetidos de desnaturação térmica, anelamento de primers específicos, e extensão enzimática por DNA polimerases termoestáveis. A inovação chave reside na detecção em tempo real de produtos de amplificação mediante sistemas de detecção fluorescente que permitem a quantificação precisa do DNA molde inicial (Higuchi *et al.*, 1993; Holland *et al.*, 1991).

Os **sistemas de detecção fluorescente** mais utilizados incluem: (1) **SYBR Green I**, um intercalante não específico que se une a qualquer DNA de dupla cadeia e produz incrementos na fluorescência proporcionais à quantidade de produto de PCR; (2) **sondas TaqMan**, oligonucleotídeos específicos marcados com fluoróforos repórter e quencher que proporcionam especificidade adicional mediante hibridação específica de sequência; e (3) **sondas molecular beacon**, estruturas de DNA em forma de grampo que mudam sua conformação e propriedades fluorescentes na presença do alvo específico (Holland *et al.*, 1991; Wittwer *et al.*, 1997).

Estratégias de quantificação

A **quantificação absoluta** implica a determinação do número exato de cópias de transcrito por unidade de amostra mediante a construção de curvas padrão utilizando diluições seriadas de padrões de concentração conhecida. Esta aproximação proporciona valores absolutos expressos em cópias por microlitro ou moléculas por célula, mas requer a disponibilidade de padrões apropriados e apresenta maior complexidade técnica (Pfaffl, 2001).

A **quantificação relativa** compara os níveis de expressão do gene objetivo entre diferentes amostras ou condições, expressando os resultados como fold-changes relativos a uma amostra de referência. Esta aproximação utiliza o método comparativo Ct (2^-ΔΔCt) e requer a normalização com genes de referência estáveis, mas apresenta maior simplicidade técnica e é menos suscetível a variações na eficiência de amplificação (Livak; Schmittgen, 2001).

Seleção e validação de genes de referência

A seleção de genes de referência apropriados constitui um aspecto crítico para a obtenção de resultados confiáveis em estudos de expressão de *vasa*. Os genes de referência ideais devem apresentar expressão estável entre diferentes estádios de desenvolvimento gonadal, tipos de tecido, e condições experimentais específicas (Andersen; Jensen; Ørntoft, 2004; Vandesompele *et al.*, 2002).

Em estudos de desenvolvimento gonadal de teleósteos, os genes mais frequentemente utilizados como referências incluem **β-actina** (ACTB), que codifica uma proteína estrutural do citoesqueleto; **fator de elongação 1α** (EF1α), envolvido na síntese proteica; **18S rRNA**, componente estrutural de ribossomos; e **gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase** (GAPDH), enzima glicolítica de expressão ubíqua (Filby; Tyler, 2007; McCurley; Callard, 2008).

A **validação da estabilidade** de genes de referência deve realizar-se mediante análises estatísticas específicas incluindo os algoritmos geNorm, NormFinder, e BestKeeper, que avaliam a variabilidade de expressão entre amostras e identificam combinações ótimas de genes de referência para normalização (Pfaffl *et al.*, 2004; Vandesompele *et al.*, 2002).

2.4.2. Hibridação in situ: Localização espacial de transcritos

A hibridação in situ (ISH) representa uma técnica fundamental para a caracterização de padrões espaciais de expressão gênica que complementa a informação quantitativa proporcionada por qPCR com dados de localização celular e tissular específicos (Braissant; Wahli, 1998; Moorman *et al.*, 2001). No contexto do estudo da expressão de *vasa*, a ISH permite identificar tipos celulares específicos que expressam o gene e caracterizar a distribuição espacial de transcritos dentro da arquitetura gonadal complexa.

Fundamentos metodológicos

A ISH baseia-se na hibridação específica de sondas de DNA ou RNA marcadas com repórteres detectáveis (radioisótopos, fluoróforos, haptenos) a sequências complementares de mRNA alvo em seções tissulares preservadas mediante fixação química. A especificidade de hibridação está determinada pela complementaridade de sequência entre a sonda e o alvo, enquanto as condições de astringência (temperatura, concentração salina, pH) controlam a tolerância a pareamentos imperfeitos (Braissant; Wahli, 1998).

Preparação de sondas específicas

As **sondas antisentido** representam o tipo de sonda mais utilizado para ISH, consistindo em sequências de RNA complementares ao mRNA alvo que permitem hibridação específica. Para o gene *vasa*, as sondas tipicamente correspondem a regiões de 300-800 nucleotídeos que incluem sequências codificantes únicas com baixa homologia a outros genes para minimizar reações cruzadas (Vasconcelos *et al.*, 2019)

As **sondas controle** (sentido) contêm sequências idênticas ao mRNA alvo e servem como controles negativos que não devem mostrar hibridação específica sob condições apropriadas de astringência. A comparação entre padrões de hibridação de sondas antisentido e sentido permite distinguir entre hibridação específica e união não específica (Moorman *et al.*, 2001).

Detecção e análise de sinais

Os sistemas de **detecção colorimétrica** utilizam enzimas como fosfatase alcalina ou peroxidase conjugadas a anticorpos específicos que reconhecem

haptenos incorporados nas sondas (digoxigenina, biotina). A atividade enzimática gera produtos coloridos insolúveis que precipitam nos sítios de hibridação, permitindo a visualização microscópica e a análise morfológica detalhada (Braissant; Wahli, 1998).

Os sistemas de **detecção fluorescente** (FISH) empregam fluoróforos diretamente conjugados às sondas ou sistemas de amplificação baseados em anticorpos fluorescentes. Esta aproximação permite quantificação mais precisa da intensidade de sinal e facilita experimentos de co-localização múltipla utilizando fluoróforos com espectros de excitação/emissão distintos (Levsky; Singer, 2003).

2.4.3. Análise histológica quantitativa

Morfometria e análise de imagem

A análise histológica quantitativa proporciona informação objetiva sobre características estruturais de tecidos gonadais que complementa os dados de expressão gênica com parâmetros morfológicos quantificáveis (Howard; Reed, 2004; Weibel, 1981-) Em estudos de desenvolvimento gonadal, essas análises incluem a quantificação de densidades celulares, áreas ocupadas por diferentes tipos celulares, índices de proliferação, e parâmetros morfométricos de estruturas específicas.

Estereologia e análise tridimensional

Os métodos **estereológicos** permitem a estimação de parâmetros tridimensionais (volumes, áreas superficiais, longitudes) a partir de observações bidimensionais em seções histológicas mediante técnicas de amostragem sistemática e aplicação de princípios geométricos específicos (Gundersen *et al.*, 1988; Weibel, 1981-).

O **número total de células** numa população específica pode estimar-se utilizando o método do disector óptico, que conta células em volumes de referência definidos e extrapola à amostra completa mediante fatores de correção estereológicos. Esta aproximação elimina vieses associados com

diferenças no tamanho celular e proporciona estimativas não enviesadas de densidades numéricas (Gundersen *et al.*, 1988; Sterio, 1984).

Análise de correlação morfofuncional

A **integração de dados** morfológicos e moleculares permite estabelecer correlações entre níveis de expressão gênica e características estruturais específicas mediante análises estatísticas multivariadas. Essas correlações proporcionam insights sobre relações causa-efeito entre atividade gênica e fenótipos celulares/tissulares observados (Reed; Howard, 1998).

2.5. Aplicações biotecnológicas do gene *vasa*: Revolução em biotecnologias reprodutivas

2.5.1. *vasa* como marcador molecular: Identificação e purificação de células germinativas

La A especificidade excepcional do gene *vasa* para células germinativas revolucionou as metodologias de identificação, isolamento, e manipulação dessas células em espécies de teleósteos, estabelecendo protocolos padronizados que foram adotados universalmente pela comunidade científica dedicada a biotecnologias reprodutivas (Lacerda *et al.*, 2010; Yoshizaki *et al.*, 2011).

Citometria de fluxo e separação celular

A **citometria de fluxo** baseada na expressão de *vasa* permite a identificação e separação de células germinativas de populações celulares heterogêneas com pureza superior a 95% e rendimentos que atingem 10^6-10^7 células por grama de tecido gonadal (Ichida *et al.*, 2017; Yano; Suzuki; Yoshizaki, 2008). Esta tecnologia utiliza anticorpos específicos contra a proteína *VASA* ou células transgênicas que expressam proteínas fluorescentes sob controle do promotor *vasa* para marcar células objetivo antes da separação física.

Os **parâmetros de dispersão de luz** (forward scatter, side scatter) proporcionam informação adicional sobre o tamanho e complexidade interna das células, permitindo a discriminação entre diferentes subpopulações de

células germinativas baseando-se em características físicas além de marcadores moleculares. Esta aproximação é particularmente útil para distinguir entre espermatogônias tipo A indiferenciadas e diferenciadas (Ichida *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018).

Separação celular ativada magneticamente (MACS)

A tecnologia **MACS** utiliza anticorpos contra *VASA* conjugados com microesferas magnéticas para permitir a separação de células germinativas mediante a aplicação de campos magnéticos graduados. Esta metodologia apresenta vantagens significativas incluindo processamento de volumes grandes de suspensões celulares, custos operacionais reduzidos, e compatibilidade com protocolos de cultivo celular subsequentes (Lacerda *et al.*, 2013; Miltenyi *et al.*, 1990).

A **eficiência de purificação** pode atingir níveis de 90-95% de pureza com recuperações de 70-85% de células objetivo, valores que são suficientes para a maioria de aplicações biotecnológicas incluindo criopreservação, transplante celular, e cultivo in vitro (Higaki *et al.*, 2018; Rivers *et al.*, 2020).

2.5.2. Otimização de protocolos de criopreservação

Monitoramento de viabilidade pós-descongelamento

A expressão de *vasa* serve como um **indicador molecular de viabilidade** que permite avaliar a integridade funcional de células germinativas depois de procedimentos de criopreservação. As células que mantêm níveis apropriados de expressão de *vasa* pós-descongelamento apresentam maior probabilidade de sobrevivência a longo prazo e retenção de capacidade de diferenciação (Higaki *et al.*, 2018; Lee; Iwasaki; Yoshizaki, 2016).

Os **protocolos de avaliação** incluem análises por RT-qPCR de níveis de expressão de *vasa* em células descongeladas comparados com controles frescos, complementados com ensaios de viabilidade celular (exclusão de azul de tripano, atividade metabólica) e análises morfológicas de integridade estrutural (Rivers *et al.*, 2022; Seki *et al.*, 2017).

Otimização de formulações crioprotetoras

A identificação de formulações crioprotetoras otimizadas para células germinativas específicas utiliza a expressão de *vasa* como critério de avaliação principal. Diferentes combinações de crioprotetores penetrantes (dimetilsulfóxido, etilenglicol, propilenglicol) e não penetrantes (sacarose, trealose, polivinilpirrolidona) são avaliadas baseando-se em sua capacidade para preservar a expressão gênica pós-descongelamento (Higaki *et al.*, 2018; Lee; Iwasaki; Yoshizaki, 2016).

Os **protocolos otimizados** tipicamente utilizam concentrações de crioprotetores de 10-15% v/v para penetrantes e 0,1-0,3 M para não penetrantes, com taxas de resfriamento controladas de 1-2°C/min até -80°C seguidas de imersão em nitrogênio líquido. Essas condições preservam a expressão de *vasa* em 80-90% dos níveis de controle em múltiplas espécies de teleósteos (Rivers *et al.*, 2020; Seki *et al.*, 2017).

2.5.3. Transplante de células germinativas: Tecnologia de substituição

Monitoramento de colonização e estabelecimento

O **rastreio de células transplantadas** utiliza a expressão de *vasa* como marcador para monitorar a migração, colonização, e estabelecimento de células germinativas em hospedeiros receptores. Esta aproximação permite avaliar a eficiência de diferentes técnicas de transplante e otimizar protocolos para maximizar o sucesso de colonização (Takeuchi; Yoshizaki; Takeuchi, 2003; Ye *et al.*, 2017).

As **metodologias de detecção** incluem RT-PCR específica de espécie que distingue entre células transplantadas (doadoras) e células endógenas (receptor), hibridação in situ para localização espacial de células colonizantes, e imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos contra variantes de *VASA* características do doador (Takeuchi; Yoshizaki; Takeuchi, 2003; Yoshizaki *et al.*, 2011).

Confirmação de origem doadora em gametos

A **verificação genética** de gametos produzidos por hospedeiros quiméricos utiliza análises de expressão de *vasa* específicos de espécie como critério preliminar para confirmar a origem doadora, complementado com análises de marcadores genéticos nucleares e mitocondriais para verificação definitiva (Okutsu *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2020).

Os **protocolos de análise** incluem amplificação por PCR de regiões polimórficas do gene *vasa* que apresentam diferenças de sequência entre espécies doadora e receptora, seguida de sequenciamento direto ou análise de polimorfismos de longitude de fragmentos de restrição (RFLP) para identificação inequívoca da origem celular (Ye *et al.*, 2017).

2.5.4. Desenvolvimento de linhagens transgênicas

Sistemas repórteres fluorescentes

O desenvolvimento de **linhagens transgênicas** que expressam proteínas fluorescentes sob controle de elementos regulatórios do gene *vasa* revolucionou o estudo de células germinativas ao permitir visualização em tempo real de populações celulares específicas durante o desenvolvimento e em aplicações biotecnológicas (Lin *et al.*, 2012; Yoshizaki *et al.*, 2005).

As **construções mais utilizadas** incluem fusões do promotor *vasa* (2-5 kb upstream do sítio de início de transcrição) com genes repórteres como GFP, mCherry, ou DsRed que proporcionam sinais fluorescentes específicos em células germinativas. Essas construções frequentemente incluem a região 3'UTR de *vasa* para assegurar padrões de expressão apropriados e localização subcelular correta (Lin *et al.*, 2012; Yano; Suzuki; Yoshizaki, 2008).

Aplicações em biotecnologia reprodutiva

As **linhagens transgênicas *vasa*-repórter** facilitam múltiplas aplicações biotecnológicas incluindo: (1) **purificação de células germinativas** por citometria de fluxo baseada em fluorescência com eficiências superiores a 98%; (2) **monitoramento de transplantes celulares** mediante visualização

direta de células colonizantes; (3) **estudos de desenvolvimento** com seguimento de células germinativas individuais durante a ontogenia; e (4) **screening de compostos** para identificar fatores que afetam a sobrevivência ou diferenciação de células germinativas (Yano; Suzuki; Yoshizaki, 2008; Yoshizaki *et al.*, 2005).

A **integração estável** de construções transgênicas permite o estabelecimento de linhagens reprodutoras que transmitem o transgene à descendência, facilitando a produção contínua de células germinativas marcadas para aplicações biotecnológicas de longa duração (Lin *et al.*, 2012; Takeuchi; Yoshizaki; Takeuchi, 2003).

Em conclusão, esta revisão bibliográfica exaustiva estabelece o marco conceitual necessário para compreender a importância fundamental do gene *vasa* como marcador molecular de células germinativas e seu potencial transformador em biotecnologias reprodutivas aplicadas a espécies amazônicas de importância comercial. A integração de conhecimentos sobre desenvolvimento gonadal, regulação gênica, e metodologias moleculares proporciona a base científica para o desenho experimental da presente investigação e a interpretação de resultados no contexto mais amplo da conservação genética e sustentabilidade aquícola.

3. HIPÓTESIS E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

A expressão do gene *vasa* em células germinativas de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* apresenta um padrão diferencial de acordo com o estádio de desenvolvimento gonadal, com níveis mais elevados nos estádios iniciais (imaturo e regeneração) correlacionados com maior densidade de espermatogônias, constituindo a fonte ótima de células germinativas para biotecnologias reprodutivas como criopreservação e transplante celular.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

Caracterizar a expressão do gene *vasa* durante a espermatogênese em *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* segundo o estádio de desenvolvimento gonadal e analisar suas aplicações em biotecnologias reprodutivas de peixes.

3.2.2. Objetivos específicos

a. Realizar uma revisão sistemática sobre as aplicações biotecnológicas do gene *vasa* em células germinativas de peixes.
b. Analisar a expressão do gene *vasa* em diferentes tecidos de *C. macropomum* e *P. brachypomus*.
c. Determinar o padrão de expressão do gene *vasa* nas gônadas de ambas as espécies de acordo com o estádio de desenvolvimento gonadal.
d. Examinar a relação entre a expressão do gene *vasa* e as características histológicas dos testículos, incluindo a presença e distribuição de espermatogônias em diferentes estádios de desenvolvimento.
e. Estabelecer o estádio de desenvolvimento gonadal ideal para a obtenção de espermatogônias destinadas a biotecnologias reprodutivas.

4. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

ANDERSEN, Christian B.F. *et al.* Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-Box ATPase bound to RNA. **Science**, [*s. l.*], v. 313, n. 5795, p. 1968–1972, 2006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16931718/. Acesso em: 29 jul. 2025.

ANDERSEN, Claus Lindbjerg; JENSEN, Jens Ledet; ØRNTOFT, Torben Falck. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, [*s. l.*], v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15289330/. Acesso em: 29 jul. 2025.

ANDERSON, Jill T. *et al.* Extremely long-distance seed dispersal by an overfished amazonian frugivore. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [*s. l.*], v. 278, n. 1723, p. 3329–3335, 2011. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21429923/. Acesso em: 29 jul. 2025.

BARTHEM, Ronaldo.; GOULDING, Michael. **The catfish connection : ecology, migration, and conservation of Amazon predators**. [*S. l.*]: Columbia University Press, 1997.

BERKOVITZ, Barry; SHELLIS, Peter. **The teeth of vertebrates**. [*S. l.*]: Elsevier Inc., 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2018.954. Acesso em: 29 jul. 2025.

BEUX, Luis Fernando; ZANIBONI FILHO, Evoy. Survival and the growth of pintado (Pseudoplatystoma corruscans) post-larvae on different salinities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [*s. l.*], v. 50, n. 5, p. 821–829, 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/j/babt/a/DBBt6rNBh5gnTzCggRPSV8g/?lang=en. Acesso em: 1 ago. 2025.

BRAAT, Arie Koen *et al.* Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of *vasa* RNA. **Developmental Dynamics**, [*s. l.*], v. 216, n. 2, p. 153–167, 1999. Disponível em:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10536055/. Acesso em: 29 jul. 2025.

BRAISSANT, Olivier; WAHLI, Walter. A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labelled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. **Biochemica**, [*s. l.*], v. 1, p. 10–16, 1998.

BROWN-PETERSON, Nancy J. *et al.* A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, [*s. l.*], v. 3, n. 1, p. 52–70, 2011. Disponível em: /doi/pdf/10.1080/19425120.2011.555724. Acesso em: 29 jul. 2025.

CAROLSFELD, J. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, [*s. l.*], v. 63, n. 2, p. 472–489, 2003. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x. Acesso em: 17 mar. 2021.

CARRERA, Pilar *et al. VASA* mediates translation through interaction with a Drosophila yIF2 homolog. **Molecular Cell**, [*s. l.*], v. 5, n. 1, p. 181–187, 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10678180/. Acesso em: 29 jul. 2025.

CHAMBERS, Ian *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, [*s. l.*], v. 113, n. 5, p. 643–655, 2003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12787505/. Acesso em: 29 jul. 2025.

CHELLAPPA, S. *et al.* Annual variation in energy reserves in male three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatm L. (Pisces, Gasterosteidae). **Journal of Fish Biology**, [*s. l.*], v. 35, n. 2, p. 275–286, 1989. Disponível em: /doi/pdf/10.1111/j.1095-8649.1989.tb02976.x. Acesso em: 29 jul. 2025.

CHEN, Linxiang *et al.* Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 9, n. 2, 2014.

CORREA, Sandra Bibiana *et al.* Evolutionary Perspectives on Seed Consumption and Dispersal by Fishes. **BioScience**, [*s. l.*], v. 57, n. 9, p. 748–756, 2007. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1641/B570907. Acesso em: 29 jul. 2025.

DE OLIVEIRA, Fernando G. *et al.* Desenvolvimento larval de Brycon hilarii (Characiformes, Characidae). **Iheringia. Série Zoologia**, [*s. l.*], v. 102, n. 1, p. 62–70, 2012. Disponível em:

https://www.scielo.br/j/isz/a/SXj8GtpC7Sy9K9CqFY5kwys/?lang=pt. Acesso em: 1 ago. 2025.

DERVEAUX, Stefaan; VANDESOMPELE, Jo; HELLEMANS, Jan. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, [*s. l.*], v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19969088/. Acesso em: 29 jul. 2025.

DEVLIN, Robert H.; NAGAHAMA, Yoshitaka. **Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences**. [*S. l.*]: Elsevier, 2002.

ESCOBAR L., Maria Doris *et al.* Delimiting Evolutionarily Significant Units of the Fish, *Piaractus brachypomus* (Characiformes: Serrasalmidae), from the Orinoco and Amazon River Basins with Insight on Routes of Historical Connectivity. *In*: , 2015. **Journal of Heredity**. [*S. l.*]: Oxford Academic, 2015. p. 428–438. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1093/jhered/esv047. Acesso em: 8 mar. 2025.

ESCOBAR L, Maria D *et al.* A new species of Piaractus (Characiformes: Serrasalmidae) from the Orinoco Basin with a redescription of *Piaractus brachypomus*. **Journal of fish biology**, England, v. 95, n. 2, p. 411–427, 2019.

EWEN-CAMPEN, Ben; SCHWAGER, Evelyn E.; EXTAVOUR, Cassandra G.M. The molecular machinery of germ line specification. **Molecular Reproduction and Development**, [*s. l.*], v. 77, n. 1, p. 3–18, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19790240/. Acesso em: 29 jul. 2025.

EXTAVOUR, Cassandra G.; AKAM, Michael. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: Epigenesis and preformation. **Development**, [*s. l.*], v. 130, n. 24, p. 5869–5884, 2003.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Rone: [*s. n.*], 2020.

FILBY, Amy L.; TYLER, Charles R. Appropriate “housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. **BMC Molecular Biology**, [*s. l.*], v. 8, 2007. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17288598/. Acesso em: 29 jul. 2025.

GARCÍA-LÓPEZ, Ángel *et al.* Ovarian development and plasma sex steroid levels in

cultured female Senegalese sole Solea senegalensis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [*s. l.*], v. 146, n. 3, p. 342–354, 2007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1095643306005022. Acesso em: 29 jul. 2025.

GIRALDEZ, Antonio J. *et al.* Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. **Science**, [*s. l.*], v. 312, n. 5770, p. 75–79, 2006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16484454/. Acesso em: 29 jul. 2025.

GJEDREM, Trygve; ROBINSON, Nick; RYE, Morten. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. **Aquaculture**, [*s. l.*], v. 350–353, p. 117–129, 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848612002128. Acesso em: 29 jul. 2025.

GONÇALVES, Raissa Alves *et al.* Genetic basis of *Colossoma macropomum* broodstock: Perspectives for an improvement program. **Journal of the World Aquaculture Society**, [*s. l.*], v. 50, n. 3, p. 633–644, 2019.

GOULDING, Michael. **The fishes and the forest : explorations in Amazonian natural history**. [*S. l.*]: University of California Press, 1980. Disponível em: https://books.google.com/books/about/The_Fishes_and_the_Forest.html?hl=es&id=krIsP5RbFx0C. Acesso em: 29 jul. 2025.

GOULDING, Michael; CARVALHO, Mírian Leal. Life history and management of the tambaqui (Colossoma macropomum, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, [*s. l.*], v. 1, n. 2, p. 107–133, 1982. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbzool/a/gQRV47qdG65ttvNgnDzb6cd/. Acesso em: 8 mar. 2025.

GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, [*s. l.*], v. 53, n. 3, p. 521–542, 1998. Disponível em: /doi/pdf/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00999.x. Acesso em: 29 jul. 2025.

GUNDERSEN, H. J.G. *et al.* The new stereological tools: Disector, fractionator, mucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, [*s. l.*], v. 96, n. 10, p. 857–881, 1988. Disponível em:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3056461/. Acesso em: 29 jul. 2025.

GUSTAFSON, Eric A.; WESSEL, Gary M. *Vasa* genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. **BioEssays**, [*s. l.*], v. 32, n. 7, p. 626–637, 2010.

HACKETT, Jamie A. *et al.* Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. **Science**, [*s. l.*], v. 339, n. 6118, p. 448–452, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23223451/. Acesso em: 29 jul. 2025.

HARTUNG, Odelya; FORBES, Meredyth M.; MARLOW, Florence L. Zebrafish *vasa* is required for germ-cell differentiation and maintenance. **Molecular Reproduction and Development**, [*s. l.*], v. 81, n. 10, p. 946–961, 2014.

HAY, Bruce; JAN, Lily Yeh; JAN, Yuh Nung. A protein component of Drosophila polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. **Cell**, [*s. l.*], v. 55, n. 4, p. 577–587, 1988.

HIGAKI, Shogo *et al.* Cryopreservation of male and female gonial cells by vitrification in the critically endangered cyprinid honmoroko Gnathopogon caerulescens. **Fish Physiology and Biochemistry**, [*s. l.*], v. 44, n. 2, p. 503–513, 2018. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-017-0449-x. Acesso em: 23 nov. 2024.

HIGUCHI, Russell *et al.* Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio/Technology**, [*s. l.*], v. 11, n. 9, p. 1026–1030, 1993. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nbt0993-1026. Acesso em: 29 jul. 2025.

HOLLAND, Pamela M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*s. l.*], v. 88, n. 16, p. 7276, 1991. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC52277/. Acesso em: 29 jul. 2025.

HORN, Michael H. Evidence for dispersal of fig seeds by the fruit-eating characid fish Brycon guatemalensis Regan in a Costa Rican tropical rain forest. **Oecologia**, [*s. l.*], v. 109, n. 2, p. 259–264, 1997. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28307177/. Acesso em: 29 jul. 2025.

HOWARD, Vyvyan; REED, Matthew. **Unbiased Stereology : Three-Dimensional Measurement in Microscopy**. London: Garland Science, 2004. Disponível em: https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.4324/9780203006399/unbiased-stereology-vyvyan-howard-matthew-reed. Acesso em: 29 jul. 2025.

HUANG, Jinqiang *et al.* Molecular characterization, sexually dimorphic expression, and functional analysis of 3'-untranslated region of *vasa* gene in half-smooth tongue sole (Cynoglossus semilaevis). **Theriogenology**, [*s. l.*], v. 82, n. 2, p. 213–224, 2014.

HUNTER, J. R.; MACEWICZ, B. Measurement of Spawning Frequency in Multiple Spawning Fishes. [*s. l.*], 2004.

ICHIDA, Kensuke *et al.* **Flow-cytometric enrichment of Pacific bluefin tuna type A spermatogonia based on light-scattering properties**. [*S. l.*]: Elsevier, 2017.

JANKOWSKY, E. *et al.* Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. **Science**, [*s. l.*], v. 291, n. 5501, p. 121–125, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11141562/. Acesso em: 29 jul. 2025.

JOHNSTONE, O.; LASKO, P. Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos. **Annual Review of Genetics**, [*s. l.*], v. 35, p. 365–406, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11700288/. Acesso em: 29 jul. 2025.

JOMORI, Rosângela Kiyoko *et al.* Growth and survival of pacu Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, [*s. l.*], v. 221, n. 1–4, p. 277–287, 2003. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848603000693. Acesso em: 29 jul. 2025.

KEDDE, Martijn *et al.* RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. **Cell**, [*s. l.*], v. 131, n. 7, p. 1273–1286, 2007. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18155131/. Acesso em: 29 jul. 2025.

KEHLER, James *et al.* Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO Reports**, [*s. l.*], v. 5, n. 11, p. 1078–1083, 2004. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15486564/. Acesso em: 29 jul. 2025.

KNAUT, Holger *et al.* Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. **Journal of Cell Biology**, [*s. l.*], v. 149, n. 4, p. 875–888, 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10811828/. Acesso em: 29 jul. 2025.

KOLMANN, M. A. *et al.* Phylogenomics of Piranhas and Pacus (Serrasalmidae) Uncovers How Dietary Convergence and Parallelism Obfuscate Traditional Morphological Taxonomy. **Systematic Biology**, [*s. l.*], v. 70, n. 3, p. 576–592, 2021. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syaa065. Acesso em: 8 mar. 2025.

KRØVEL, Anne Vatland; OLSEN, Lisbeth Charlotte. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. **Developmental Biology**, [*s. l.*], v. 271, n. 1, p. 190–197, 2004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.004.

LACERDA, Samyra M.S.N. *et al.* A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) Model. **PLOS ONE**, [*s. l.*], v. 5, n. 5, p. e10740, 2010. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010740. Acesso em: 9 jul. 2022.

LACERDA, S. M.S.N. *et al.* Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, [*s. l.*], v. 39, n. 1, p. 3–11, 2013.

LAHNSTEINER, F. *et al.* Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. **Journal of Fish Biology**, [*s. l.*], v. 47, n. 3, p. 492–508, 1995. Disponível em: /doi/pdf/10.1111/j.1095-8649.1995.tb01917.x. Acesso em: 29 jul. 2025.

LANDINES, M.; ROCRIGUEZ, L.; RODRIGUEZ, D. Estrategias De Alimentación Para Cachama Y Yamú a Partir De Prácticas De Restricción Alimenticia. **Acuioriente**, [*s. l.*], n. April, p. 45, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/266416402%0Ahttps://n9.cl/m8w1q.

LASKO, Paul F.; ASHBURNER, Michael. The product of the Drosophila gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. **Nature**, [*s. l.*], v. 335, n. 6191, p. 611–617, 1988. Disponível em: https://www.nature.com/articles/335611a0. Acesso em: 7

mar. 2025.

LEE, Seungki; IWASAKI, Yoshiko; YOSHIZAKI, Goro. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. **Cryobiology**, [*s. l.*], v. 73, n. 2, p. 286–290, 2016.

LESCH, Bluma J. *et al.* A set of genes critical to deèelopment is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*s. l.*], v. 110, n. 40, p. 16061–16066, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043772/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LEU, David H.; DRAPER, Bruce W. The ziwi promoter drives germline-specific gene expression in zebrafish. **Developmental Dynamics**, [*s. l.*], v. 239, n. 10, p. 2714–2721, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20737503/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LEVAVI-SIVAN, B. *et al.* Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **General and Comparative Endocrinology**, [*s. l.*], v. 165, n. 3, p. 412–437, 2010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016648009003220. Acesso em: 29 jul. 2025.

LEVSKY, Jeffrey M.; SINGER, Robert H. Fluorescence in situ hybridization: Past, present and future. **Journal of Cell Science**, [*s. l.*], v. 116, n. 14, p. 2833–2838, 2003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12808017/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LI, Mingyou *et al.* Multiple regulatory regions control the transcription of medaka germ gene *vasa*. **Biochimie**, [*s. l.*], v. 95, n. 4, p. 850–857, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23232104/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LIN, Fan *et al.* Transient and stable GFP expression in germ cells by the *vasa* regulatory sequences from the red Seabream (Pagrus major). **International Journal of Biological Sciences**, [*s. l.*], v. 8, n. 6, p. 882–890, 2012.

LINDER, Patrick *et al.* Birth of the D-E-A-D box [5]. **Nature**, [*s. l.*], v. 337, n. 6203, p. 121–122, 1989. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2563148/. Acesso

em: 29 jul. 2025.

LINDER, Patrick. Dead-box proteins: A family affair - Active and passive players in RNP-remodeling. **Nucleic Acids Research**, [*s. l.*], v. 34, n. 15, p. 4168–4180, 2006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16936318/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LITTLE, Shawn C. *et al.* Independent and coordinate trafficking of single Drosophila germ plasm mRNAs. **Nature Cell Biology**, [*s. l.*], v. 17, n. 5, p. 558–568, 2015. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25848747/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. **Methods**, [*s. l.*], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LOPERA-BARRERO, N. M. **Conservation of Brycon orbignyanus natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction**. [*S. l.*]: Pontificia Universidad Catolica de Chile, Facultad de Agronomia e Ingenieria Forestal, 2009. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202009000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 10 mar. 2025.

LORENZEN, Kai; BEVERIDGE, Malcolm C.M.; MANGEL, Marc. Cultured fish: Integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. **Biological Reviews**, [*s. l.*], v. 87, n. 3, p. 639–660, 2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22221879/. Acesso em: 29 jul. 2025.

LOUBENS, G; PANFILI, J. **Biologie de *Piaractus brachypomus* (Teleostei : Serrasalmidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne)Ichthyol. Explor. Freshwaters**. [*S. l.: s. n.*], 2001.

LOVSHIN, Leonard L. So Fruitful a Fish: Ecology, Conservation, and Aquaculture of the Amazon's Tambaquí. **Transactions of the American Fisheries Society**, [*s. l.*], v. 127, n. 6, p. 1082–1082, 1998. Disponível em: https://agris.fao.org/search/en/providers/122621/records/6477616aa3fd11e4303beb4f. Acesso em: 8 mar. 2025.

LOWERRE-BARBIERI, Susan K. *et al.* Reproductive Timing in Marine Fishes: Variability, Temporal Scales, and Methods. **Marine and Coastal Fisheries**, [*s. l.*], v.

3, n. 1, p. 71–91, 2011. Disponível em: /doi/pdf/10.1080/19425120.2011.556932. Acesso em: 29 jul. 2025.

LUCAS, Christine M. Within Flood Season Variation in Fruit Consumption and Seed Dispersal by Two Characin Fishes of the Amazon. **Biotropica**, [*s. l.*], v. 40, n. 5, p. 581–589, 2008. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1744-7429.2008.00415.x. Acesso em: 8 mar. 2025.

LUNDBERG, John G. *et al.* The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. *In*: PHYLOGENY AND CLASSIFICATION OF NEOTROPICAL FISHES. [*S. l.*]: Museu de Ciências e Tecnologia, 1998. p. 13–48. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/235980526.

MATSUYAMA, Ryota *et al.* Isolation and antimicrobial susceptibility of Plesiomonas shigelloides from great cormorants (Phalacrocorax carbo hanedae) in Gifu and Shiga Prefectures, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, [*s. l.*], v. 77, n. 9, p. 1179–1181, 2015.

MATTEI; XAVIER. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Canadian Journal of Zoology**, [*s. l.*], v. 69, n. 12, p. 3038–3055, 1991. Disponível em: https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1991CaJZ...69.3038M/abstract. Acesso em: 29 jul. 2025.

MCCURLEY, Amy T.; CALLARD, Gloria V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: Male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. **BMC Molecular Biology**, [*s. l.*], v. 9, 2008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19014500/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MEGOSH, Heather B. *et al.* The Role of PIWI and the miRNA Machinery in Drosophila Germline Determination. **Current Biology**, [*s. l.*], v. 16, n. 19, p. 1884–1894, 2006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16949822/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MILLER, Melanie A.; OLIVAS, Wendy M. Roles of Puf proteins in mRNA degradation and translation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, [*s. l.*], v. 2, n. 4, p. 471–492, 2011. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21957038/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MILTENYI, Stefan *et al.* High gradient magnetic cell separation with MACS.

Cytometry, [*s. l.*], v. 11, n. 2, p. 231–238, 1990. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1690625/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MISHIMA, Yuichiro *et al.* Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by Zebrafish miR-430. **Current Biology**, [*s. l.*], v. 16, n. 21, p. 2135–2142, 2006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17084698/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MIURA, T. *et al.* Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (Anguilla japonica). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*s. l.*], v. 88, n. 13, p. 5774, 1991. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC51960/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MOCHIZUKI, K.; NISHIMIYA-FUJISAWA, C.; FUJISAWA, T. Universal occurrence of the *vasa*-related genes among metazoans and their germline expression in Hydra. **Development Genes and Evolution**, [*s. l.*], v. 211, n. 6, p. 299–308, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11466525/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MOORMAN, A. F.M. *et al.* Sensitive nonradioactive detection of mRNA in tissue sections: Novel application of the whole-mount in situ hybridization protocol. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [*s. l.*], v. 49, n. 1, p. 1–8, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11118473/. Acesso em: 29 jul. 2025.

MORRISON, Carol M. **Histology of the Atlantic cod, Gadus morhua: an atlas. Part four. Eleutheroembryo and larva.** [*S. l.*]: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, 1987. Disponível em: https://books.google.com/books/about/Histology_of_the_Atlantic_Cod_Gadus_Morh.html?hl=es&id=W5gKAQAAMAAJ. Acesso em: 29 jul. 2025.

MURUA, H; SABORIDO-REY, F. Female Reproductive Strategies of Marine Fish Species of the North Atlantic. **J. Northw. Atl. Fish. Sci**, [*s. l.*], v. 33, p. 23–31, 2003. Disponível em: http://journal.nafo.int. Acesso em: 29 jul. 2025.

NAKAMURA, A. *et al.* Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during Drosophila oogenesis. **Development**, [*s. l.*], v. 128, n. 17, p. 3233–3242, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11546740/. Acesso em: 29 jul. 2025.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, [*s. l.*], v. 35, n. 1, p. 197–206, 2009. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716890/. Acesso em: 29 jul. 2025.

NUÑEZ, Jésus *et al.* Induced breeding and larval rearing of Surubí, Pseudoplatystoma fasciatum (Linnaeus, 1766), from the Bolivian Amazon. **Aquaculture Research**, [*s. l.*], v. 39, n. 7, p. 764–776, 2008. Disponível em: /doi/pdf/10.1111/j.1365-2109.2008.01928.x. Acesso em: 29 jul. 2025.

NÚÑEZ, Jesús *et al.* Hatching rate and larval growth variations in Pseudoplatystoma punctifer: Maternal and paternal effects. **Aquaculture Research**, [*s. l.*], v. 42, n. 6, p. 764–775, 2011. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2109.2011.02803.x. Acesso em: 8 mar. 2025.

NÚÑEZ, Jesús; DUPONCHELLE, Fabrice. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, [*s. l.*], v. 35, n. 1, p. 167–180, 2009. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18668334/. Acesso em: 29 jul. 2025.

OKUTSU, Tomoyuki *et al.* Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, [*s. l.*], v. 317, n. 5844, p. 1517, 2007. Disponível em: https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1145626. Acesso em: 11 jul. 2022.

ORTÍ, Guillermo *et al.* **Phylogeny of the Serrasalmidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences**. [*S. l.: s. n.*], 2008. Disponível em: www.sbg.org.br. .

PAUSE, A.; SONENBERG, N. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. **The EMBO Journal**, [*s. l.*], v. 11, n. 7, p. 2643–2654, 1992. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1378397/. Acesso em: 9 ago. 2025.

PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, [*s. l.*], v. 29, n. 9, p. E45, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328886/. Acesso em: 29 jul. 2025.

PFAFFL, Michael W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, [*s. l.*], v. 26, n. 6, p. 509–515, 2004.

Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15127793/. Acesso em: 29 jul. 2025.

RAGHUVEER, Kavarthapu; SENTHILKUMARAN, Balasubramanian. Cloning and differential expression pattern of *vasa* in the developing and recrudescing gonads of catfish, Clarias gariepinus. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [*s. l.*], v. 157, n. 1, p. 79–85, 2010.

RAZ, Erez. Primordial germ-cell development: The zebrafish perspective. **Nature Reviews Genetics**, [*s. l.*], v. 4, n. 9, p. 690–700, 2003. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrg1154. Acesso em: 29 jul. 2025.

RAZ, Erez. The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. **Genome biology**, [*s. l.*], v. 1, n. 3, p. reviews1017.1, 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11178242/. Acesso em: 29 jul. 2025.

REED, M. G.; HOWARD, C. V. Surface-weighted star volume: concept and estimation. **Journal of Microscopy**, [*s. l.*], v. 190, n. 3, p. 350–356, 1998. Disponível em: /doi/pdf/10.1046/j.1365-2818.1998.00331.x. Acesso em: 29 jul. 2025.

REYNALTE-TATAJE, D. *et al.* Embryonic and larval development of the piracanjuba, Brycon orbignyanus Valenciennes, 1850 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [*s. l.*], v. 26, p. 67–71, 2004.

REYNOLDS, Nicola *et al.* Dazl binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells. **Human Molecular Genetics**, [*s. l.*], v. 14, n. 24, p. 3899–3909, 2005. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi414. Acesso em: 29 jul. 2025.

RIVERS, Nicola *et al.* Cryopreservation and Flow Cytometric Analysis of Ovarian Tissue in Murray River Rainbowfish, Melanotaenia fluviatilis. **Animals**, [*s. l.*], v. 12, n. 6, p. 1–13, 2022.

RIVERS, Nicola *et al.* Cryopreservation of testicular tissue from Murray River Rainbowfish, Melanotaenia fluviatilis. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-020-76378-7.

ROBLES, Vanesa *et al.* Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. **Aquaculture**, [*s. l.*], v. 472, p. 4–20, 2017.

ROLLAND, Antoine D. *et al.* Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis. **BMC Genomics**, [*s. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–22, 2009. Disponível em: https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-546. Acesso em: 9 mar. 2025.

RUIZ-CARUS, R. Register of an exceptionally large redbellied pacu, *Piaractus brachypomus* (Teleostei, Characidae), in east-central Florida, with gonad and diet analyses. **Florida Scientist**, [*s. l.*], p. 184–188, 2003. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/24321037. Acesso em: 8 mar. 2025.

SACHS, Michael *et al.* Bivalent Chromatin Marks Developmental Regulatory Genes in the Mouse Embryonic Germline InVivo. **Cell Reports**, [*s. l.*], v. 3, n. 6, p. 1777–1784, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727241/. Acesso em: 29 jul. 2025.

SAINT-PAUL, Ulrich. **Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: A review**. [*S. l.: s. n.*], 1986. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848686903297. Acesso em: 11 jul. 2022.

SANTOS, C. H.A. *et al.* Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellites. **Animal Genetics**, [*s. l.*], v. 47, n. 3, p. 373–376, 2016. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/age.12422. Acesso em: 8 mar. 2025.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da usina hidrelétrica Tucuruí.** Brasília: Eletronorte, 2007. Disponível em: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/2024-03/010036083.pdf. Acesso em: 29 jul. 2025.

SCHULZ, Rüdiger W *et al.* Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, [*s. l.*], v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648009000744. Acesso em: 11 jul. 2022.

SEISENBERGER, Stefanie *et al.* The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. **Molecular Cell**, [*s. l.*], v. 48, n. 6,

p. 849–862, 2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23219530/. Acesso em: 29 jul. 2025.

SEKI, Shinsuke *et al.* Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. **Scientific Reports 2017 7:1**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: https://www.nature.com/articles/srep43185. Acesso em: 1 ago. 2025.

SENGOKU, Toru *et al.* Structural Basis for RNA Unwinding by the DEAD-Box Protein Drosophila *Vasa*. **Cell**, [*s. l.*], v. 125, n. 2, p. 287–300, 2006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16630817/. Acesso em: 9 ago. 2025.

SIEGFRIED, Kellee R.; NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane. Germ line control of female sex determination in zebrafish. **Developmental Biology**, [*s. l.*], v. 324, n. 2, p. 277–287, 2008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18930041/. Acesso em: 1 ago. 2025.

SILVA, Jose *et al.* Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. **Cell**, [*s. l.*], v. 138, n. 4, p. 722–737, 2009. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19703398/. Acesso em: 29 jul. 2025.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **Journal of Microscopy**, [*s. l.*], v. 134, n. 2, p. 127–136, 1984. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6737468/. Acesso em: 29 jul. 2025.

STREIT, D. P. *et al.* Germplasm banking and its role in the development of the fish genetic improvement programme in Brazil. **Cryo-Letters**, [*s. l.*], v. 36, n. 6, p. 399–404, 2015.

STYHLER, Sylvia *et al. vasa* is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. **Development**, [*s. l.*], v. 125, n. 9, p. 1569–1578, 1998. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9521895/. Acesso em: 29 jul. 2025.

TAKEUCHI, Yutaka; YOSHIZAKI, Goro; TAKEUCHI, Toshio. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. **Biology of Reproduction**, [*s. l.*], v. 69, n. 4, p. 1142–1149, 2003. Disponível em: https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/69/4/1142/2712600. Acesso em: 11 jul. 2022.

TANNER, N. Kyle *et al.* The Q motif: A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. **Molecular Cell**, [*s. l.*], v. 11, n. 1, p. 127–138, 2003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12535527/. Acesso em: 29 jul. 2025.

THOMPSON, Andrew W. *et al.* A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalmidae) and a comparison of species tree methods. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [*s. l.*], v. 81, p. 242–257, 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1055790314002310. Acesso em: 29 jul. 2025.

THOMSON, Travis *et al.* Isolation of new polar granule components in Drosophila reveals P body and ER associated proteins. **Mechanisms of Development**, [*s. l.*], v. 125, n. 9–10, p. 865–873, 2008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18590813/. Acesso em: 29 jul. 2025.

TOMKIEWICZ, J; MORGAN, M J; SABORIDO-REY, F. Available Information for Estimating Reproductive Potential of Northwest Atlantic Groundfish Stocks. **J. Northw. Atl. Fish. Sci**, [*s. l.*], v. 33, p. 1–21, 2003. Disponível em: http://journal.nafo.int. Acesso em: 29 jul. 2025.

UPDIKE, Dustin; STROME, Susan. P granule assembly and function in Caenorhabditis elegans germ cells. **Journal of Andrology**, [*s. l.*], v. 31, n. 1, p. 53–60, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19875490/. Acesso em: 29 jul. 2025.

VAL, Adalberto L.; DE OLIVEIRA, Alzira M. **Colossoma macropomum—A tropical fish model for biology and aquaculture**. [*S. l.*]: John Wiley and Sons Inc, 2021.

VANDESOMPELE, Jo *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, [*s. l.*], v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002. Disponível em: https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-research0034. Acesso em: 29 jul. 2025.

VASCONCELOS, Ana Carina Nogueira *et al.* Isolation and characterization of a germ cell marker in teleost fish Colossoma macropomum. **Gene**, [*s. l.*], v. 683, p. 54–60,

2019.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reproducao de peixes teleosteos: teoria e pratica.** Maringá: EDUEM, 1996. Disponível em: https://books.google.com/books/about/Biologia_da_reprodução_de_peixes_tele.html?hl=es&id=ExrBAAAACAAJ. Acesso em: 29 jul. 2025.

VORONINA, Ekaterina *et al.* RNA granules in germ cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [*s. l.*], v. 3, n. 12, 2011. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21768607/. Acesso em: 29 jul. 2025.

WALLACE, Robin A.; SELMAN, Kelly. Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. **Integrative and Comparative Biology**, [*s. l.*], v. 21, n. 2, p. 325–343, 1981. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1093/icb/21.2.325. Acesso em: 9 ago. 2025.

WEIBEL, E. R. **Stereological Methods. Vol. 1. Practical Methods for Biological Morphometry**. London: Academic Press, 1981-. ISSN 1365-2818. Disponível em: /doi/pdf/10.1111/j.1365-2818.1981.tb01205.x. Acesso em: 29 jul. 2025.

WEIDINGER, Gilbert *et al.* dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. **Current Biology**, [*s. l.*], v. 13, n. 16, p. 1429–1434, 2003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12932328/. Acesso em: 29 jul. 2025.

WINEMILLER, K. O.; JEPSEN, D. B. Effects of seasonality and fish movement on tropical river food webs. **Journal of Fish Biology**, [*s. l.*], v. 53, n. SUPPL. A, p. 267–296, 1998. Disponível em: /doi/pdf/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01032.x. Acesso em: 29 jul. 2025.

WITTWER, Carl T. *et al.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **BioTechniques**, [*s. l.*], v. 22, n. 1, p. 130–138, 1997. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8994660/. Acesso em: 29 jul. 2025.

WU, Xiaomeng *et al.* Cloning, expression promoter analysis of *vasa* gene in Japanese flounder (Paralichthys olivaceus). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [*s. l.*], v. 167, n. 1, p. 41–50, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.06.004.

XU, Dongdong *et al.* Production of donor-derived eggs after ovarian germ cell transplantation into the gonads of adult, germ cell-less, triploid hybrid fish. **Biology of Reproduction**, [*s. l.*], v. 103, n. 6, p. 1289–1299, 2020. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioaa168. Acesso em: 23 nov. 2024.

XU, Hongyan; GUI, Jianfang; HONG, Yunhan. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (Carassius auratus gibelio), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. **Developmental Dynamics**, [*s. l.*], v. 233, n. 3, p. 872–882, 2005. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15880437/. Acesso em: 29 jul. 2025.

YANO, Ayaka; SUZUKI, Kensuke; YOSHIZAKI, Goro. Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout *vasa* regulatory regions. **Biology of Reproduction**, [*s. l.*], v. 78, n. 1, p. 151–158, 2008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17901070/. Acesso em: 29 jul. 2025.

YE, Huan *et al.* Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon Acipenser sinensis. **Theriogenology**, [*s. l.*], v. 94, p. 37–47, 2017.

YOON, Christina; KAWAKAMI, Koichi; HOPKINS, Nancy. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. **Development**, [*s. l.*], v. 124, n. 16, p. 3157–3165, 1997. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1242/dev.124.16.3157. Acesso em: 4 maio 2025.

YOSHIZAKI, Goro *et al.* Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. **Molecular Reproduction and Development**, [*s. l.*], v. 55, n. 4, p. 364–371, 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10694742/. Acesso em: 29 jul. 2025.

YOSHIZAKI, Goro *et al.* Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. **Biology of Reproduction**, [*s. l.*], v. 73, n. 1, p. 88–93, 2005. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15744027/. Acesso em: 27 nov. 2024.

YOSHIZAKI, Goro *et al.* Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for

the preservation of genetic resources. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, [*s. l.*], v. 6, n. 1, p. 55–61, 2011.

YU, Fan *et al.* Characterization of *vasa* in the gonads of different ploidy fish. **Gene**, [*s. l.*], v. 574, n. 2, p. 337–344, 2015.

ZHAO, Chunyan *et al.* Identification of type A spermatogonia in turbot (Scophthalmus maximus) using a new cell-surface marker of Lymphocyte antigen 75 (ly75/CD205). **Theriogenology**, [*s. l.*], v. 113, p. 137–145, 2018.

ZOHAR, Yonathan *et al.* Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, [*s. l.*], v. 165, n. 3, p. 438–455, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19393655/. Acesso em: 29 jul. 2025.

CAPÍTULO II

Applications of *VASA* Expression in the Germ Cell Biotechnology of Fish: A Systematic Review

Artigo elaborado seguindo modelo de estrutura e formatação do periódico *Animal Reproduction*

Article type: Review Article

Running title: *VASA* expression in fish germ cell biotechnology

Applications of *VASA* Expression in the Germ Cell Biotechnology of Fish: A Systematic Review

Enrique Garcia-Candela[1,2,3], Milagros Cabrera-Soregui[1,2], Diógenes H. Siqueira-Silva[4], Fernanda de Mello[1]; Danilo Pedro Streit Jr[1, 5]

[1] AQUAM Research Group, Animal Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

[2] CITEacuícola pesquero Ahuashiyacu, Instituto Tecnológico de la Producción, San Martín, Peru.

[3] Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Peru.

[4] Research Group of Studies on the Reproduction of Amazon Fish (GERPA/LANEC), Biology Faculty, Federal University of South and Southern of Pará (UNIFESSPA), Av. dos Ipês, S/N, 68507-590 Marabá, PA, Brazil

[5] Veterinary Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Correspondence: Danilo Pedro Streit Jr[1] (danilo.streit@ufrgs.br)

Abstract

This comprehensive review underscores the importance of the *vasa* gene as a molecular indicator of germ cells in the development of reproductive technologies applied to bony fish. A total of 44 studies published up to March 2024 were analyzed, which included 27 species belonging to 10 different orders. The most commonly employed techniques were RT–PCR/qPCR (70.5%), in situ hybridization (38.6%), and transgenesis (18.2%). The primary areas of application included germ cell transplantation (31.8%), cryopreservation (27.3%), reproductive sterilization (18.2%), and transgenesis (15.9%). The *vasa* gene has proven to be highly effective in the isolation, manipulation, and tracking of germ cells across various reproductive contexts. However, further standardization of protocols and their adaptation to a broader range of species, particularly regional and endangered ones, remain necessary. Advances in this field have the potential to transform sustainable management and improve fish genetic resources. Future research should leverage the capabilities of the *vasa* gene while addressing the methodological challenges identified. In conclusion, the *vasa* gene represents a valuable molecular tool for reproductive research and biotechnological applications in bony fish. Its continued utilization will contribute to aquaculture and conservation, as well as enhance the understanding of fish reproductive biology, ultimately strengthening aquatic ecosystems and preserving biodiversity in the long term.

Keywords: aquaculture, *PGC,* germ cells, reproductive biotechnology, teleost fish.

Introduction

The *vasa* gene encodes a highly evolutionarily conserved ATP-dependent RNA helicase whose expression remains restricted to the germline (1). It was originally identified in *Drosophila melanogaster* (2), where it is differentiated into primordial germ cells. *Vasa* orthologs are selectively expressed in the germ cells of a wide range of different invertebrates and vertebrates (1,3–5). This evolutionary conservation of specific expression patterns has allowed researchers to differentiate *vasa* as a definitive molecular marker of germ cells used in a variety of biological applications, including developmental studies and reproductive biotechnology (6,7).

In teleost fish, the *vasa* gene encodes an ATP-dependent RNA helicase that plays a crucial role in germ cell development through post transcriptional regulation of specific mRNAs required for PGC specification, migration, and maintenance. By facilitating the translation of key germline-specific genes and suppressing somatic gene expression, *Vasa* ensures proper germ cell fate and survival. Its expression is exclusively detected in primordial germ cells (PGCs) and gonocytes, as extensively demonstrated in model species such as zebrafish (8,9) and medaka (10). This specific expression pattern has also been characterized in commercially important aquaculture species such as rainbow trout (11), common carp (12), and channel catfish (13). Recent advances in genome editing via CRISPR/Cas9 have enabled efficient targeting of *vasa* and its regulatory regions, revealing its essential functions in germ cell development (14) and allowing the generation of germ cell-deficient fish for applications in aquaculture and conservation (15). These developments have led to significant advances in research on reproductive biology and biotechnological applications in these species.

Although the utility of *vasa* expression has been well demonstrated, preliminary validation studies are needed for each newly studied species to confirm the specificity of its expression in target cells. Furthermore, a comprehensive understanding of *vasa* expression in each specific reproductive context is necessary to fully exploit its potential (16). For example, the molecular basis of the pleiotropic effects of *vasa* mutants beyond the germline has only recently been elucidated (8).

This systematic review addresses the potential of *vasa* gene expression in biotechnological applications involving teleost germ cells. In this way, we answer the

following questions: what is the real applicability of this gene as a molecular marker for cryopreservation, transgenesis, and sterility in these animals? In this review, we identified studies that have used *vasa* as a molecular marker of germ cells, and in these contexts, we addressed knowledge gaps and missing areas where more research is needed. Reinforcing the scientific basis that establishes the *vasa* gene as a reliable marker of germ cells in teleost fish is necessary to strengthen its application in solving problems of genetic and reproductive improvement in aquaculture, including gamete cryopreservation, production of transgenic fish, and induction of reproductive sterility.

Methodology

Primary study design

This systematic review followed the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines. The protocol was registered to ensure transparency and minimize bias in the selection and analysis of studies. A comprehensive review of research published in English from 2000 until March 2024 was conducted, addressing the use of the *vasa* gene in biotechnological applications related to teleost fish germ cells, specifically in areas such as cryopreservation, transgenesis, and sterilization.

Intervention and comparison groups

In the selected studies, experimental groups in which *vasa* gene expression was manipulated were observed, as were the control groups. Comparisons between different species and biotechnological applications were also carried out.

Information sources

Searches were conducted in three major electronic databases: PubMed, Scopus, and ScienceDirect, using controlled vocabulary when available. The bibliographic exploration was performed from March 9 to 11, 2024, and all retrieved references were exported in RIS, BibTeX, and CSV formats, enabling structure management in the free web platform Rayyan (https://www.rayyan.ai/).

Search strategy

To minimize bias, searches were independently conducted in three major electronic databases: PubMed, Scopus, and ScienceDirect. Customized search strategies were developed for each database, combining controlled vocabulary and free-text terms related to "*vasa* gene", "teleost fish", "germ cells", and biotechnology applications. Logical connectors (AND, OR) were used to refine the search and expand coverage to synonyms and related terms. The full search strings for each database are provided in Table 1.

Inclusion and exclusion criteria

The criteria established to determine eligibility are provided in Table 2. These criteria were applied sequentially, first during the selection phase by title and abstract and then during the full-text review.

Study selection and bias control

The selection process was conducted in two phases via the Rayyan platform to ensure systematic documentation:

- Initial screening:
    - Two independent reviewers screened titles and abstracts using predefined eligibility criteria.
    - Disagreements were resolved through consensus discussion.
    - Records were tagged to indicate reasons for exclusion.
- Full-text review:
    - The same reviewers independently assessed the full texts of potentially eligible studies.
    - A standardized form was used to document the reasons for exclusion.
    - A third reviewer was consulted to resolve any persistent disagreements.

The entire selection process was documented in a PRISMA flow diagram (Fig.1).

Quality assessment

Each included study was evaluated for the following:

- Clear description of experimental protocols
- Appropriate controls and replicates

- Validation of methods used to detect expression
- Statistical analysis when applicable
- Potential sources of bias

Studies not meeting the quality criteria were excluded and documented in the PRISMA flow diagram.

Data extraction

From the studies included after the final selection, two reviewers manually extracted the following information on a standardized form in Microsoft Excel. The extracted information included reference, study design, species, biotechnological application, *vasa* detection method, type of germ cells, main findings, limitations, and possible biases. This task was carried out manually to overcome the limitations of automated data extraction in Rayyan.

Data synthesis and analysis

The following measures were taken to ensure systematic analysis:

- The data collected in Excel were used to create descriptive tables, summarizing the following:
    - Key characteristics of the studies
    - Methodological trends by application type and species
    - Main findings and limitations
- Both reviewers independently extracted the data and crosschecked them for accuracy.
- Discrepancies in data extraction were resolved through discussion
- Studies were categorized by biotechnological application and species studied
- A qualitative synthesis was performed due to the heterogeneity in methods and outcomes.
- Data visualization was created via descriptive figures and tables.
- Analysis was performed manually since Rayyan only supports the initial screening stages.

Results

Search results and study selection

From the studies included after the final selection, two reviewers systematically extracted the following information via a standardized form in Microsoft Excel: reference, study design, species, biotechnological application, *vasa* detection method, type of germ cells, main findings, limitations, and possible biases. Although Rayyan facilitates the initial screening of references, manual data extraction was necessary since the platform lacks support for the detailed extraction of experimental methodologies, technical parameters, and specific research outcomes required for this systematic review. Critical evaluation of methodological consistency and reproducibility challenges revealed significant gaps in protocol standardization and species representation across biotechnological applications.

General characteristics of the selected studies

The oldest study was published in 2000, whereas the most recent study was published in 2024. A progressive increase in the number of publications has been observed, particularly since 2010. If between 2000 and 2009, an average of one to two studies were published per year, from 2010 onward, a notable increase was recorded, reaching its peak with the publication of 8 articles in 2014. A constant rate of approximately 4--6 articles per year was subsequently maintained until 2020. In recent years, there has been a slight decrease, with the publication of only three studies in both 2021 and 2022, and as of March 2024, two studies have been published (Fig.2). However, this growth pattern reveals a critical concentration bias: over 60% of publications focus on just 4 model species (zebrafish, medaka, rainbow trout, and Japanese flounder), while commercially important regional species remain drastically understudied. This model species bias creates a fundamental gap between research achievements and practical aquaculture applications.

Biotechnological applications examined

Germ cell transplantation was the objective of 31.8% of the studies analyzed, making this the most frequently investigated application despite evidence that alternative markers (e.g., dnd) may provide superior results for specific transplantation contexts. Moreover, 27.3% of the studies focused on germ cell cryopreservation, yet none included economic

viability assessments or validated protocols beyond 5 years. 18.2% evaluated methods to induce reproductive sterility, but lacked comparative evaluation with alternative sterilization approaches. Only 15.9% investigated transgenesis through germ cells, and 6.8% analyzed *vasa* expression patterns during gonadal development, revealing a significant research gap in sex determination applications (Fig.3).

Species studied

Among the 27 species spanning 10 different orders, four model species emerged as the most extensively studied: zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*) as primary model organisms, followed by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) as aquaculture models. These species together represented more than 40% of all the studies analyzed. Additional significant contributions came from research on common carp (*Cyprinus carpio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Most of the species studied were freshwater fish (79.55%) from temperate regions (54.55%), although marine and tropical/subtropical species were also included (Fig.4).

***Vasa* expression detection methods**

Multiple techniques are often used within individual studies to detect *vasa* expression. RT–PCR was the most frequently employed method, appearing in 70.5% of the studies. qRT–PCR and in situ hybridization were also commonly used, featuring 59.1% and 38.6% of the studies, respectively. Less frequently, studies have incorporated immunohistochemistry (11.4%), transgenic lines (18.2%), Western blotting (6.8%), Northern blot (4.5%), fluorescent in situ hybridization (9.1%), and flow cytometry (4.5%). These percentages exceed 100%, as most studies have employed multiple complementary techniques to analyze *vasa* expression comprehensively. (Fig.5). This multiplicity of methods raises critical concerns about standardization and reproducibility. Our analysis identified significant methodological inconsistencies: antibody validation varied across studies, PCR conditions were rarely standardized, and only 23% of studies provided sufficient methodological detail for reproduction. Furthermore, no studies conducted inter-laboratory validation, raising questions about the reliability of comparative analyses across research groups.

Main findings by application and species

Table 3 summarizes the details of the studies that presented relevant findings for each biotechnological application, including the species examined, the methods used to detect *vasa*, the type of germ cells, and the best results.

Cryopreservation of germ cells

With respect to germ cell cryopreservation, qRT-PCR was used to identify *vasa* expression in spermatogonial stem cells of common carp after cryopreservation by slow freezing and vitrification. However, our analysis revealed 15 different cryopreservation protocols across studies, with no standardized approach emerging. In *Gnathopogon caerulescens*, spermatogonia and oogonia preservation showed post-thaw viability, but no study validated long-term storage beyond 5 years. Ovarian tissue from *Melanotaenia fluviatilis* was preserved using anti-*Vasa* antibodies and flow cytometry, yet the economic scalability of these methods remains unassessed.

Germ cell transplantation

For germ cell transplantation, spermatogonia from transgenic zebrafish achieved colonization rates of 25-30%, but these studies failed to compare *vasa* effectiveness with alternative markers like dnd. In Japanese flounder, oogonia transplantation into sterile males succeeded, though microsatellite analysis revealed donor-derived sequences in only a fraction of produced gametes. Spermatogonia and oogonia from *Acipenser sinensis* achieved up to 70% colonization in *Acipenser dabryanus* larvae, but interspecific compatibility remains largely unexplored outside model species.

Germ cell-mediated transgenesis

Stable transgenic medaka lines using *vasa* regulatory sequences achieved 50% germline transmission efficiency, but the $50,000+ cost per line makes this approach economically prohibitive for non-model species. PGC labeling in salmonids using chimeric RNA worked effectively, yet comparative analysis with other marker-based approaches is absent. Japanese flounder *vasa* promoter constructs enabled analysis of alternative splicing isoforms, though the regulatory complexity may limit broader applications.

Reproductive sterilization

Copper-sensitive shRNA constructs silencing *nanos* and *dnd* in channel catfish reduced *vasa* mRNA levels and induced functional sterility, but potential off-target effects were insufficiently evaluated. In striped catfish, CRISPR/Cas9-induced *dnd1* mutation achieved more complete germ cell depletion than *vasa* targeting, challenging the assumption that *vasa* is always optimal. Busulfan treatment eliminated *vasa*-positive cells in various species, though species-specific toxicity profiles remain unstandardized.

Sex determination and differentiation

Sexual dimorphism in *vasa* expression showed up to 5-fold higher levels in zebrafish ovaries versus testes, yet this variability complicates cross-species comparisons. *Vasa*:*EGFP* transgenic lines enabled early sex prediction, but their generation costs limit practical application. XX female yellow catfish embryos contained more *vasa*-positive PGCs than XY males at 48 hpf, though the mechanistic link between PGC number and sex determination remains unclear.

Critical Methodological Limitations

Our analysis identified several systemic issues that limit the practical application of *vasa*-based technologies: (1) lack of cross-laboratory validation in 77% of studies, (2) absence of economic viability assessments in all reviewed studies, (3) species-specific protocol adaptations that prevent standardization, and (4) insufficient comparison with alternative molecular markers in 85% of applications."

Discussion

The updated findings of this systematic review reveal critical limitations in the established *vasa*-centric paradigm of teleost fish reproductive biotechnology. While the steady increase in publications over the last two decades demonstrates growing interest in *vasa* as a germ cell marker, our analysis exposes species-specific constraints that fundamentally challenge its universal applicability (1,17).

The most extensively studied applications include germ cell transplantation (31.8%) and cryopreservation (27.3%), which leverage *vasa* expression for isolating germ cells and monitoring their fate. However, our review reveals significant species-specific variations that prevent effective standardization. In zebrafish, sexual dimorphism in *vasa* splice

variants shows expression levels up to 5-fold higher in ovaries compared to testes (18), while in half-smooth tongue sole, expression patterns change dramatically during gonadal differentiation (19). These variations create critical challenges for cross-species applications and protocol standardization.

In the field of cryopreservation, *vasa* expression detection through methods such as qRT-PCR, in situ hybridization, and immunohistochemistry has allowed examination of germ cell viability in various species, including *Cyprinus carpio*, *Gnathopogon caerulescens*, and *Melanotaenia fluviatilis* (20,21). However, our analysis identified multiple conflicting protocols across a small number of studies, with no standardized approach emerging. Furthermore, the absence of long-term viability studies raises questions about the practical implementation of genetic banks, particularly for regionally important species that remain underrepresented in the literature.

Regarding germ cell transplantation, previous research has demonstrated the usefulness of *vasa* for isolating and purifying germ cells, as well as for assessing their ability to populate host gonads (22–24). However, our critical analysis reveals that alternative markers often provide superior results. Dnd knockout zebrafish showed complete germ cell absence, while *vasa* knockouts retained partial populations (25), suggesting that for certain applications, *vasa* might not be the optimal choice. These findings challenge the assumption that *vasa* is universally superior and suggest that marker selection should be tailored to specific applications and species.

Germ cell-mediated transgenesis benefits from *vasa* regulatory regions to direct transgene expression, achieving stable lines with efficiencies up to 50% in F1 generation (26,27). However, the economic constraints of generating transgenic lines limit this approach to model species, creating a significant gap between laboratory research and commercial applications. Reproductive sterilization strategies using *vasa* as a marker to evaluate gene silencing or CRISPR/Cas9 editing in catfish and other species (15,25,28) show promise, but require critical assessment of off-target effects and species-specific responses.

The analysis of dimorphic *vasa* expression patterns has provided valuable insights into sex determination mechanisms (18,19), yet the practical application of these findings remains limited. Further research is needed to understand how *vasa* expression interacts with other key genes and environmental factors affecting sexual differentiation in

different species. Our review identified a significant geographic bias, with tropical and subtropical species representing only 45.45% of studies despite their commercial importance, and marine species being particularly underrepresented (20.45%).

Although our review included a wide taxonomic range across 27 species from 10 different orders, the concentration on model organisms reveals a fundamental disconnect between research focus and aquaculture needs (29). This expansion gap is particularly evident when considering that most protocols lack validation in regional or endangered species (16,24). At the methodological level, while robust techniques such as qRT-PCR/RT-PCR (70.5/59.1%) and in situ hybridization (38.6%) dominate the literature, the variability in their implementation prevents standardized approaches (30,31).

Our critical analysis suggests that the field requires a paradigm shift from *vasa*-centric approaches toward integrated, species-specific strategies that consider alternative markers (15,25). The evidence that dnd often outperforms *vasa* for specific applications like sterilization, combined with the promising results of multi-marker approaches (such as *vasa+gfrα1* in Pacific bluefin tuna), indicates that the future lies in tailored marker selection rather than universal application of any single gene (32,33). Additionally, economic viability assessments must become a standard component of research to bridge the gap between laboratory success and commercial implementation (22,34).

Further standardized assays and protocols are necessary to improve precision and reproducibility across species and laboratories (30,31). The field would benefit from systematic comparison of *vasa* with alternative markers to determine optimal approaches for each specific application and species. Expanding these technologies to commercially relevant regional species, particularly in tropical regions and marine environments, remains essential for translating research advances into practical aquaculture and conservation benefits.

Conclusion

This critical review reveals significant limitations in *vasa* gene expression as a universal marker for teleost reproductive biotechnology. While *vasa* has advanced cryopreservation, transplantation, transgenesis, and sterilization applications, our analysis identified key challenges: species-specific expression variations preventing

standardization; methodological inconsistencies across studies; economic barriers limiting application to non-model species; and insufficient comparison with alternative markers like dnd, which often show superior performance in specific contexts.

The field requires evolution from a *vasa*-centric approach toward integrated, species-specific strategies. Future research must prioritize: standardized protocols for commercially important species; comparative evaluation of alternative markers; expansion to tropical and marine species; and economic feasibility assessment. This shift is essential to translate laboratory successes into viable applications that benefit aquaculture and conservation across a broader range of teleost species.

Author contributions

E.G.C. wrote the main manuscript text and performed conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, and writing. **M.C.S.** curated the data and contributed to writing and manuscript revision. **F.M.**, **D.H.S.S.** and **D.P.S.J.** supervised the work and participated in writing and reviewing the manuscript. All the authors reviewed the final version.

Funding

This work was funded by the own resources of the AQUAM Research Group (UFRGS) and the CITE productive San Martín (ITP).

Ethical approval

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Raz E. Minireview The function and regulation of vasa -like genes in germ-cell development Erez Raz. Genome Biol. 2000;1(3):1–6.

2. Hay B, Jan LY, Jan YN. A protein component of Drosophila polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. Cell. 1988;55(4):577–87.

3. Fang X, Yan Z, Wen-xuan Z, Feng-jiao D, Xiao-kai W, Xi-yuan Z. The expression ofvasa gene during zebrafish (Danio rerio) oogenesis. Wuhan Univ J Nat Sci. 2004;9(6):979–82.

4. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, et al. The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells. Genes Dev. 2000;14(7):841–53.

5. Dai S, Tang X, Li L, Ishidate T, Ozturk AR, Chen H, et al. A family of C. elegans VASA homologs control Argonaute pathway specificity and promote transgenerational silencing. Cell Rep [Internet]. 2022;40(10):111265. Available from: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111265

6. Gustafson EA, Wessel GM. Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. BioEssays. 2010;32(7):626–37.

7. Extavour CG, Akam M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: Epigenesis and preformation. Development. 2003;130(24):5869–84.

8. Hartung O, Forbes MM, Marlow FL. Zebrafish vasa is required for germ-cell differentiation and maintenance. Mol Reprod Dev. 2014;81(10):946–61.

9. Li M, Hong N, Xu H, Yi M, Li C, Gui J, et al. Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. Mech Dev. 2009 May 1;126(5–6):366–81.

10. Li M, Zhao H, Wei J, Zhang J, Hong Y. Medaka vasa gene has an exonic enhancer for germline expression. Gene. 2015 Jan 25;555(2):403–8.

11. Yoshizaki G, Tago Y, Takeuchi Y, Sawatari E, Kobayashi T, Takeuchi T. Green

fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. Biol Reprod [Internet]. 2005 Jul [cited 2024 Nov 27];73(1):88–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15744027/

12. Su B, Peatman E, Shang M, Thresher R, Grewe P, Patil J, et al. Expression and knockdown of primordial germ cell genes, vasa, nanos and dead end in common carp (Cyprinus carpio) embryos for transgenic sterilization and reduced sexual maturity. Aquaculture. 2014 Jan 20;420–421:S72–84.

13. Li H, Su B, Qin G, Ye Z, Alsaqufi A, Perera DA, et al. Salt sensitive tet-off-like systems to knockdown primordial germ cell genes for repressible transgenic sterilization in channel catfish, Ictalurus punctatus. Mar Drugs. 2017;15(6).

14. Li M, Liu X, Dai S, Xiao H, Wang D. High Efficiency Targeting of Non-coding Sequences Using CRISPR/Cas9 System in Tilapia. G3 Genes|Genomes|Genetics [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Feb 6];9(1):287–95. Available from: https://dx.doi.org/10.1534/g3.118.200883

15. Booncherd K, Sreebun S, Pasomboon P, Boonanuntanasarn S. Effects of CRISPR/Cas9-mediated dnd1 knockout impairs gonadal development in striped catfish. animal. 2024 Jan 1;18(1):101039.

16. Yoshizaki G, Lee S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. Stem Cell Res [Internet]. 2018;29:103–10. Available from: https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.015

17. Xu D, Yoshino T, De Bello Cioffi M, Yoshikawa H, Ino Y, Yazawa R, et al. Production of donor-derived eggs after ovarian germ cell transplantation into the gonads of adult, germ cell-less, triploid hybrid fish. Biol Reprod [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Nov 23];103(6):1289–99. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioaa168

18. Krøvel AV, Olsen LC. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development. Dev Biol [Internet]. 2004;271(1):190–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.004

19. Huang J, Chen S, Liu Y, Shao C, Lin F, Wang N, et al. Molecular characterization, sexually dimorphic expression, and functional analysis of 3'-untranslated region of vasa gene in half-smooth tongue sole (Cynoglossus semilaevis). Theriogenology. 2014 Jul 15;82(2):213–24.

20. Higaki S, Todo T, Teshima R, Tooyama I, Fujioka Y, Sakai N, et al. Cryopreservation of male and female gonial cells by vitrification in the critically endangered cyprinid honmoroko Gnathopogon caerulescens. Fish Physiol Biochem [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2024 Nov 23];44(2):503–13. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-017-0449-x

21. Rivers N, Daly J, Jones R, Currie PD, Temple-Smith P. Cryopreservation and Flow Cytometric Analysis of Ovarian Tissue in Murray River Rainbowfish, Melanotaenia fluviatilis. Animals. 2022;12(6):1–13.

22. Marinović Z, Li Q, Lujić J, Iwasaki Y, Csenki Z, Urbányi B, et al. Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation. Sci Rep. 2019;9(1):1–10.

23. Ren Y, Sun Z, Wang Y, Yu Q, Wang G, He Z, et al. Production of donor-derived offsprings by allogeneic transplantation of oogonia in the adult Japanese flounder (Paralichthys olivaceus). Aquaculture. 2021 Oct 15;543:736977.

24. Ye H, Li CJ, Yue HM, Du H, Yang XG, Yoshino T, et al. Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon Acipenser sinensis. Theriogenology. 2017 May 1;94:37–47.

25. Li Q, Fujii W, Naito K, Yoshizaki G. Application of dead end-knockout zebrafish as recipients of germ cell transplantation. Mol Reprod Dev. 2017;84(10):1100–11.

26. Li M, Guan G, Hong N, Hong Y. Multiple regulatory regions control the transcription of medaka germ gene vasa. Biochimie [Internet]. 2013 Apr [cited 2025 Jul 29];95(4):850–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23232104/

27. Lin F, Liu Q, Li M, Li Z, Hong N, Li J, et al. Transient and stable GFP

expression in germ cells by the vasa regulatory sequences from the red Seabream (Pagrus major). Int J Biol Sci. 2012;8(6):882–90.

28. Wang W, Liang S, Zou Y, Wang L, You F. Effects of busulfan on somatic cells after inhibiting germ cells in the gonads of the young olive flounder Paralichthys olivaceus. Anim Reprod Sci [Internet]. 2021;228(March):106746. Available from: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106746

29. Vasconcelos ACN, Streit DP, Octavera A, Miwa M, Kabeya N, Freitas Garcia RR, et al. Isolation and characterization of a germ cell marker in teleost fish Colossoma macropomum. Gene. 2019 Jan 30;683:54–60.

30. Wu X, Wang Z, Jiang J, Gao J, Wang J, Zhou X, et al. Cloning, expression promoter analysis of vasa gene in Japanese flounder (Paralichthys olivaceus). Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol [Internet]. 2014;167(1):41–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.06.004

31. Yu F, Zhong H, Liu G, Liu S, Zhang Z, Zhou Y, et al. Characterization of vasa in the gonads of different ploidy fish. Gene. 2015 Dec 15;574(2):337–44.

32. Ichida K, Kise K, Morita T, Yazawa R, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Flow-cytometric enrichment of Pacific bluefin tuna type A spermatogonia based on light-scattering properties. Vol. 101, Theriogenology. Elsevier; 2017. p. 91–8.

33. Du S, Zhou L, Wang X, Xu S, Li J, Song Z, et al. Characterization of vasa and dnd homologs in summer flounder, Paralichthys dentatus: Expression analysis and colocalization of PGCs during embryogenesis. Theriogenology. 2022 Mar 15;181:180–9.

34. Poursaeid S, Kalbassi MR, Hassani SN, Baharvand H. Isolation, characterization, in vitro expansion and transplantation of Caspian trout (Salmo caspius) type a spermatogonia. Gen Comp Endocrinol. 2020 Apr 1;289:113341.

35. Escuredo-Vielba R, Del Río-Portilla MA, Mata-Sotres JA, Barón-Sevilla B, Guerrero-Rentería Y, Paniagua-Chávez CG. Characterization and localization of primordial germ cells in Totoaba macdonaldi. Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol. 2018 Nov 1;225:29–37.

36. Rivers N, Daly J, Jones R, Temple-Smith P. Cryopreservation of testicular tissue from Murray River Rainbowfish, Melanotaenia fluviatilis. Sci Rep [Internet]. 2020;10(1):1–9. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-020-76378-7

37. Li Z, Li M, Hong N, Yi M, Hong Y. Formation and cultivation of medaka primordial germ cells. Cell Tissue Res [Internet]. 2014 [cited 2024 Nov 26];357(1):71–81. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24770933/

38. Pšenička M, Saito T, Linhartová Z, Gazo I. Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. Theriogenology. 2015 Apr 1;83(6):1085–92.

39. 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 [Internet]. 2019;131:61–71. Available from: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.022

40. Ichida K, Jangprai A, Khaosa-art P, Yoshizaki G, Boonanuntanasarn S. Characterization of a vasa homolog in Mekong giant catfish (Pangasianodon gigas): Potential use as a germ cell marker. Anim Reprod Sci. 2021 Nov 1;234:106869.

41. Ricci JMB, Martinez ERM, Butzge AJ, Doretto LB, Oliveira MA, Bombardelli RA, et al. Characterization of vasa homolog in a neotropical catfish, Jundiá (Rhamdia quelen): Molecular cloning and expression analysis during embryonic and larval development. Gene. 2018 May 15;654:116–26.

42. Hu Q, Xiao Q, Tian H, Li D, Li Z. Crucial role of dead end gene for primordial germ cell survival in rice field eel (Monopterus albus). Theriogenology [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Nov 26];176:188–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34624813/

43. Sasado T, Yasuoka A, Abe K, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M, et al. Distinct contributions of CXCR4b and CXCR7/RDC1 receptor systems in regulation of PGC migration revealed by medaka mutants kazura and yanagi. Dev Biol. 2008 Aug 15;320(2):328–39.

44. Zhong Z, Jiang Y, Zhao L, Wang Y, Zhang Z. Establishment and characterization of the ovary cell line derived from two-spot puffer Takifugu bimaculatus and its application for gene editing and marine toxicology. Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol. 2023 Feb 1;264:109528.

45. Majhi SK, Rasal AR, Kushwaha B, Raizada S. Heat and chemical treatments in adult Cyprinus carpio (Pisces cypriniformes) rapidly produce sterile gonads. Anim Reprod Sci. 2017 Aug 1;183:77–85.

46. Wei KH, Liu IH. Heparan sulfate glycosaminoglycans modulate migration and survival in zebrafish primordial germ cells. Theriogenology. 2014 Jun 1;81(9):1275-1285.e2.

47. Zhao C, Liu Q, Xu S, Xiao Y, Wang W, Yang J, et al. Identification of type A spermatogonia in turbot (Scophthalmus maximus) using a new cell-surface marker of Lymphocyte antigen 75 (ly75/CD205). Theriogenology. 2018 Jun 1;113:137–45.

48. Ge S, Dan C, Xiong Y, Gong G, Mei J, Guo W, et al. Identifying difference in primordial germ cells between XX female and XY male yellow catfish embryos. Gene. 2020 Nov 30;761:145037.

49. Huynh TB, Fairgrieve WT, Hayman ES, Lee JSF, Luckenbach JA. Inhibition of ovarian development and instances of sex reversal in genotypic female sablefish (Anoplopoma fimbria)exposed to elevated water temperature. Gen Comp Endocrinol. 2019 Aug 1;279:88–98.

50. Panda RP, Barman HK, Mohapatra C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from Labeo rohita testis for in vitro propagation. Theriogenology. 2011 Jul 15;76(2):241–51.

51. Yang Y, Lu L, Chen R, Yu L, Hu W, Xu D. Production of sterile mono-sex triploid yellow drum (Nibea albiflora): genotypic females and sex-reversed phenotypic males with emphasis on utilization as surrogate broodstock. Fish Physiol Biochem [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Nov 27];49(6):1277–94. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-023-01256-8

52. Li H, Su B, Qin G, Ye Z, Elaswad A, Alsaqufi A, et al. Repressible Transgenic Sterilization in Channel Catfish, Ictalurus punctatus, by Knockdown of Primordial Germ Cell Genes with Copper-Sensitive Constructs. Mar Biotechnol [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Nov 23];20(3):324–42. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10126-018-9819-3

Table 1. Search strategies used in different databases to identify relevant studies on vasa expression in teleost fish and germ cells.

Database	Search Strategy
PubMed	(vasa[All Fields] OR "vasa gene"[All Fields]) AND (fish[MeSH Terms] OR fish[All Fields] OR teleost[All Fields]) AND ("germ cells"[MeSH Terms] OR ("germ"[All Fields] AND "cells"[All Fields]) OR "germ cells"[All Fields] OR ("germ"[All Fields] AND "cell"[All Fields]) OR "germ cell"[All Fields] OR gamete[All Fields]) AND (cryopreservation[MeSH Terms] OR cryopreservation[All Fields] OR transgenic[All Fields] OR sterilization[MeSH Terms] OR sterilization[All Fields])
Scopus	TITLE-ABS-KEY(vasa OR "vasa gene") AND TITLE-ABS-KEY(fish OR teleost) AND TITLE-ABS-KEY("germ cell" OR gamete) AND TITLE-ABS-KEY(cryopreservation OR transgenic OR sterilization)
ScienceDirect	(vasa OR "vasa gene") AND (fish OR teleost) AND ("germ cell" OR gamete) AND (cryopreservation OR transgenic OR sterilization)

Table 2. Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
• Primary experimental research investigating the expression of vasa in the contexts of cryopreservation, transgenesis, or sterilization of germ cells in teleost fish. • Studies presenting data on vasa expression at the mRNA or protein level. • Research published up to March 2024 in peer-reviewed scientific journals. • Studies conducted in English.	• Reviews, meta-analyses, conference abstracts, book chapters, or theses were not considered. • Studies in nonteleost species or without aquaculture relevance were excluded. • Studies focused on basic aspects of germinal development without direct biotechnological application were discarded. • Studies written in languages other than English were omitted.

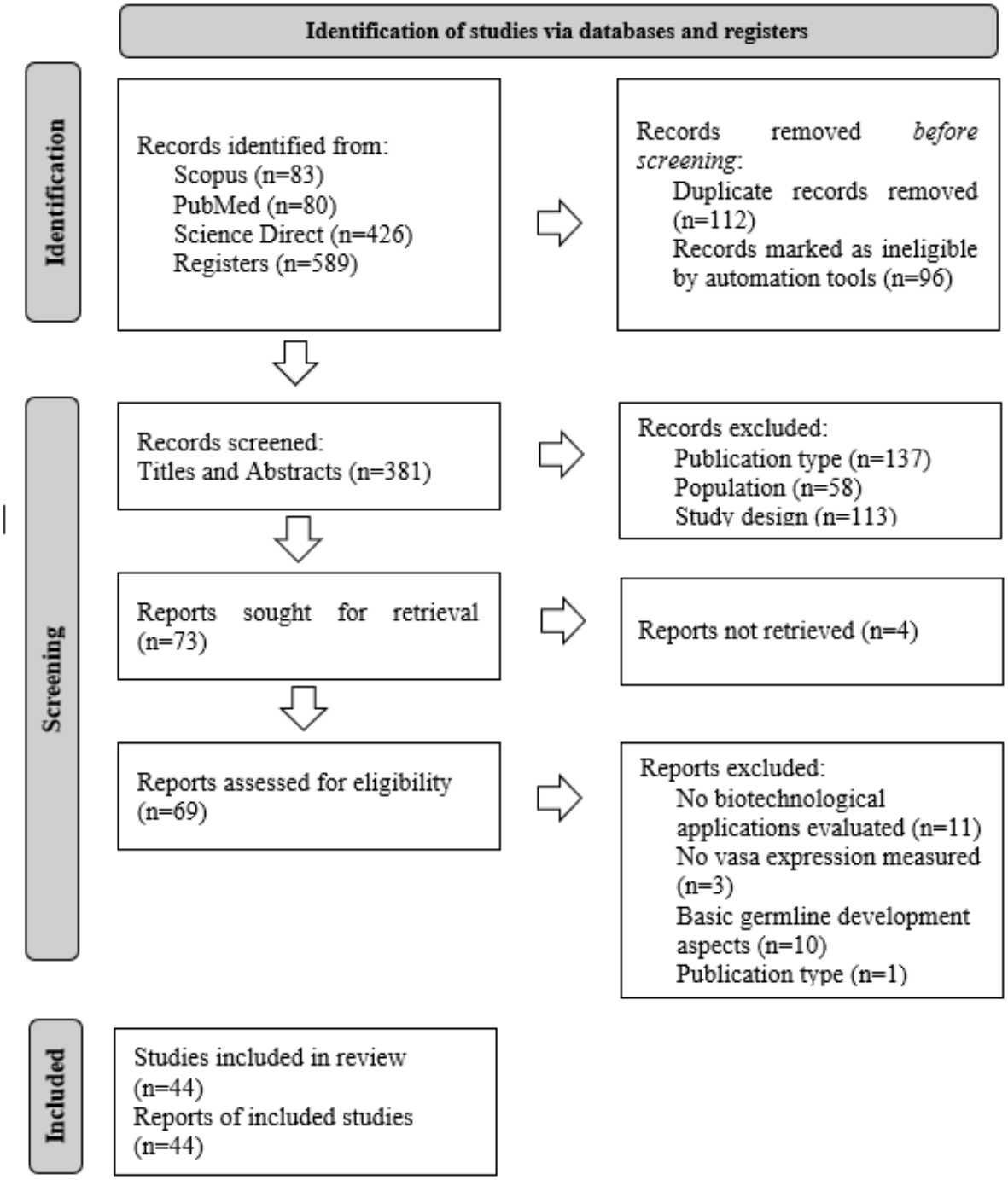

Fig.1 Graphical representation of the PRISMA flowchart detailing the procedure for selecting studies. It presents the number of records found, analyzed, evaluated for suitability, and included in the systematic review, along with the reasons for exclusion at each stage.

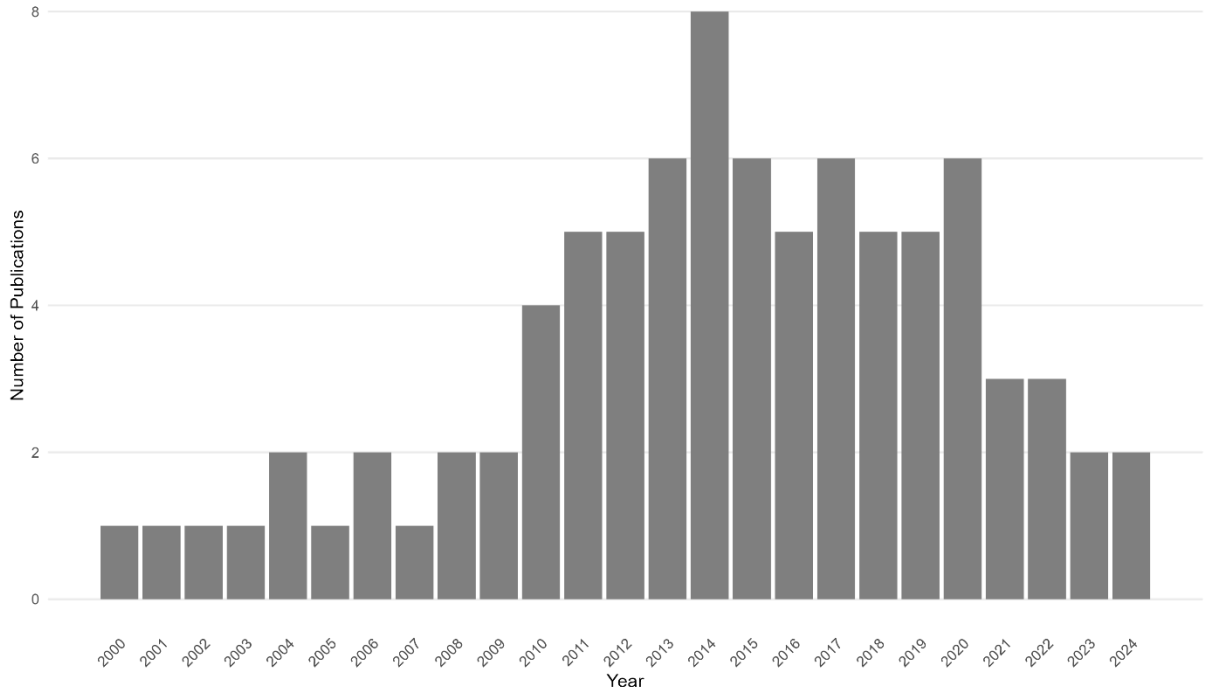

Fig.2 Number of articles per year on the application of *vasa* expression in fish germ cell biotechnologies (2000--2024)

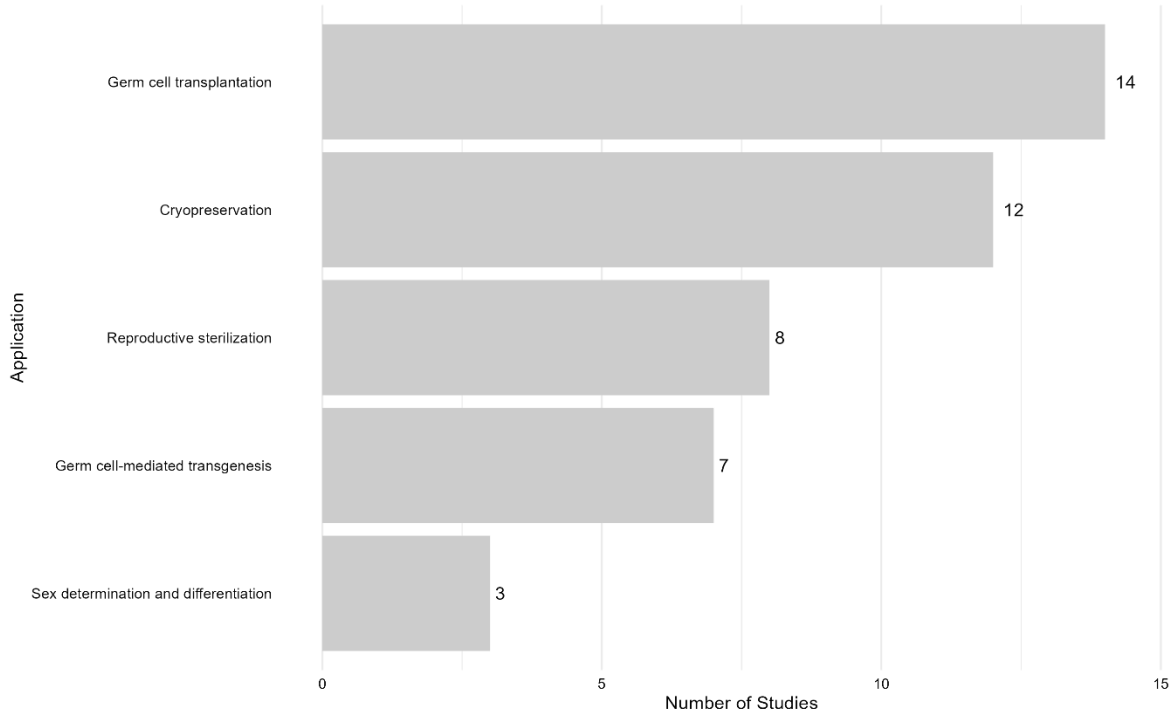

Fig.3 Distribution of biotechnological analyses in studies employing vasa expression as an indicator of germ cells in teleost fish

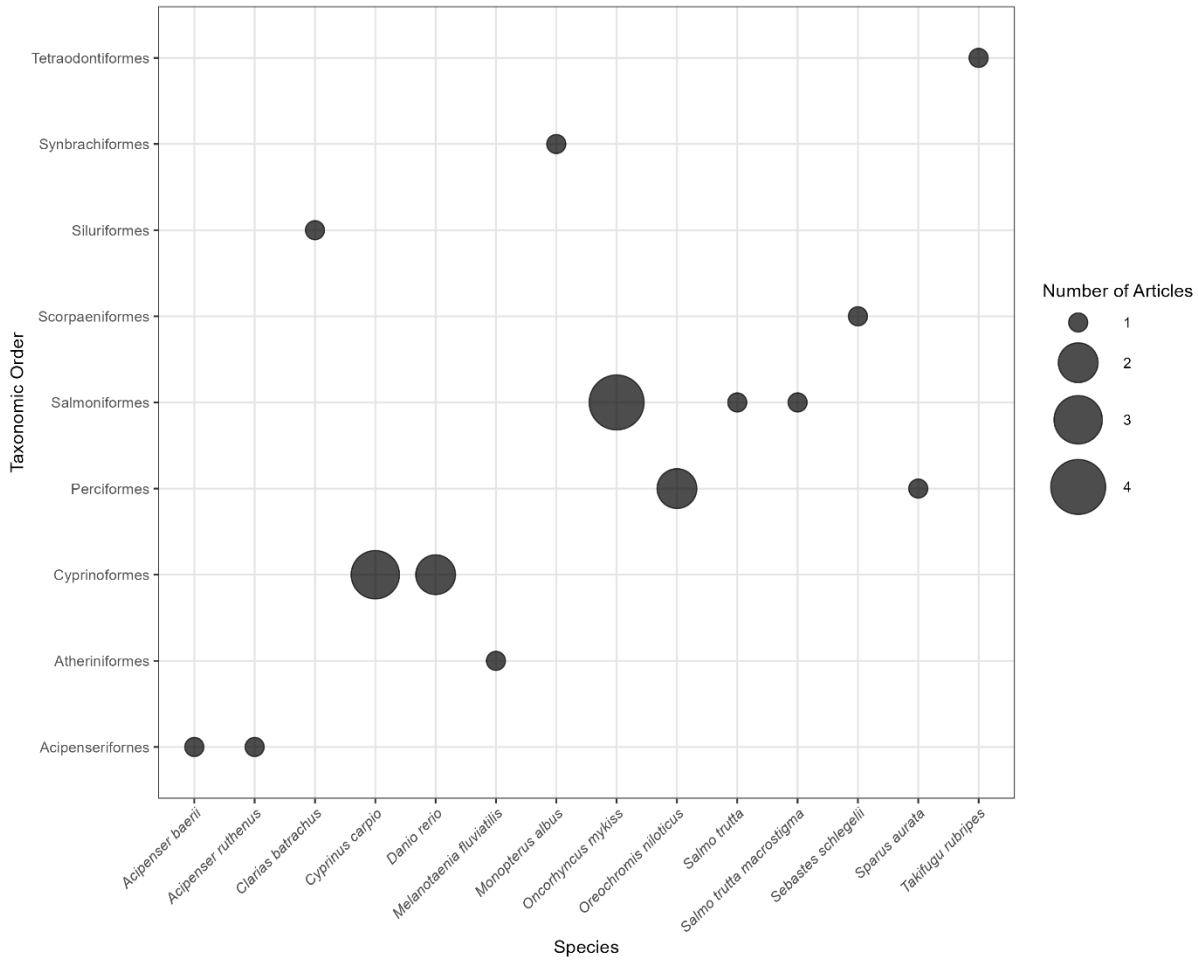

Fig.4 Distribution of studies by taxonomic order highlighting the main model and aquaculture species used in *vasa*-based biotechnology research.

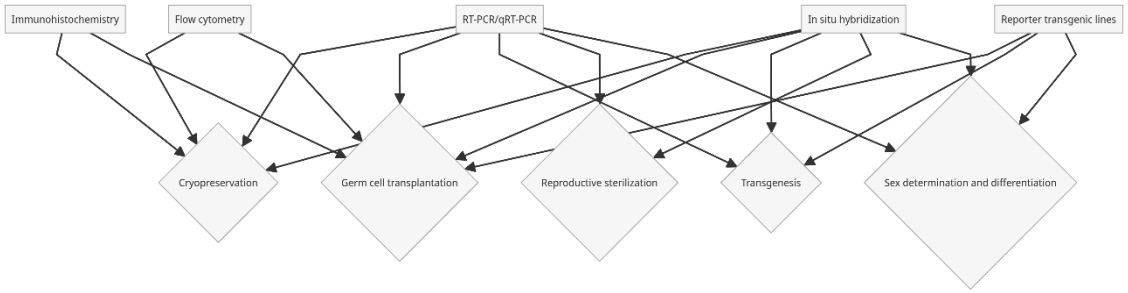

Fig.5 Venn diagram representation showing how the main methods used to detect *vasa* expression (RT–PCR/qRT–PCR, in situ hybridization, reporter transgenic lines, immunohistochemistry, and flow cytometry) relate to biotechnological objectives (cryopreservation, germ cell transplantation, transgenesis, reproductive sterilization, and sex determination and differentiation) in the studies reviewed in this systematic analysis. Overlapping areas indicate that multiple methods were used complementarily to address each specific objective.

Table 3. Summary of studies analyzed in the systematic review on the utilization of vasa expression in biotechnological technologies related to germ cells of teleost fish. It details the investigated species, biotechnological uses, vasa detection techniques, types of germ cells, and key findings of each study

Scientific Name	Common Name	Biotechnological Application	Vasa Detection Method	Type of Germ Cells	Main Findings	Reference
Danio rerio	Zebrafish	Transgenesis/germ cell transplantation	RT–PCR/qPCR/in situ hybridization/immunohistochemistry/fluorescence microscopy	PGCs/spermatogonia	Generation of vasa-GFP transgenic lines/transplantation of PGCs into dnd-knockout recipients	(25)
Totoaba macdonaldi	Totoaba	Cryopreservation	qRT–PCR/immunofluorescence/sequencing	PGCs	Detection of vasa in PGCs/recommendation to cryopreserve before migration to gonads	(35)
Carassius auratus/Cyprinus carpio	Red Crucian Carp/Common Carp	Gonadal development	RT–PCR/qRT–PCR/western blot/immunohistochemistry	Spermatogonia/oogonia	Differential vasa expression in gonads of diploid/triploid/tetraploid fish	(31)
Paralichthys olivaceus	Japanese Flounder	Transgenesis/cryopreservation	RT–PCR/qPCR/cloning/sequencing	Oogonia/spermatogonia	Identification of vasa isoforms/specific expression in gonads/regulatory regions for transgenesis	(30)
Melanotaenia fluviatilis	Australian Rainbowfish	Cryopreservation	Immunohistochemistry	Spermatogonia	Testicular tissue cryopreservation/isolation of viable spermatogonia for biobanks	(36)
Pangasianodon hypophthalmus	Striped Catfish	Reproductive sterilization	qRT–PCR/in situ hybridization	PGCs	CRISPR/Cas9 knockout of dnd1 generated germ cell-deficient fish	(15)
Cyprinus carpio	Common Carp	Reproductive sterilization/transgenesis	qRT–PCR	PGCs	Knockdown of PGC genes (vasa/nanos/dnd) reduced fertility/sterility-inducing constructs	(12)

Oryzias latipes	Medaka	PGC development	RT–PCR/immunohistochemistry/transgenic expression	PGCs	In vitro derivation of PGCs from dissociated blastomeres/migration to gonads in chimeras	(37)
Colossoma macropomum	Tambaqui	Germ cell molecular marker	RT–PCR/in situ hybridization	Oogonia/spermatogonia	Isolation and characterization of vasa as a specific germ cell marker	(29)
Acipenser baerii/A. ruthenus	Siberian Sturgeon/Sterlet	Germ cell transplantation	Immunohistochemistry/immunoblot	Spermatogonia/oogonia	Isolation and transplantation of early germ cells/generation of interspecific germ line chimeras	(38)
Oryzias latipes	Medaka	Vasa transcriptional regulation	Reporter assays/EMSA/in situ hybridization	Germ cells	Identification of an exonic enhancer controlling vasa-specific expression in germ line	(10)
Oryzias latipes	Medaka	Vasa function in PGC migration	Transgenesis/morpholinos/in situ hybridization	PGCs	Vasa is autonomously required for directed migration of PGCs to gonad/but not for specification or survival	(9)
Oryzias latipes	Medaka	Vasa transcriptional regulation	Reporter assays/EMSA	Germ cells	Identification of multiple positive and negative regulatory regions controlling vasa-specific transcription in germ cells	(26)
Danio rerio	Zebrafish	Vasa function in germinal development	Immunohistochemistry/RT–PCR/transgenic reporter lines	Germ cells	Vasa is required for meiotic differentiation/beyond pachytene progression and maintenance of germ stem cells in adults	(8)
Danio rerio	Zebrafish	Transgenesis/reproductive sterilization	RT–PCR/in situ hybridization	PGCs	Generation of dnd knockout fish as sterile recipients for germ cell transplants	(25)
Pangasianodon hypophthalmus	Striped Catfish	Germ cell molecular marker	RT–PCR/in situ hybridization	PGCs/oogonia/spermatogonia	Characterization of vasa as a marker for PGCs and germ cells/optimal window determination for transplants	(39)

Pangasianodon gigas	Mekong Giant Catfish	Germ cell molecular marker/cryopreservation	RT–PCR/in situ hybridization	Spermatogonia/spermatocytes	Use of vasa to identify undifferentiated germ cells in dissociated testicular suspensions for cryopreservation	(40)
Paralichthys dentatus	Summer Flounder	Gonadal development/transgenesis	RT–PCR/qRT–PCR/in situ hybridization/fluorescent in situ hybridization	PGCs	Colocalization of vasa and dnd in PGCs during embryonic migration/potential to generate dnd knockout recipients	(33)
Rhamdia quelen	Jundia	Germ cell molecular marker	RT–PCR/qPCR/in situ hybridization	PGCs/oogonia/spermatogonia	Characterization of vasa as a marker for PGCs and germ cells/description of PGC migration route	(41)
Monopterus albus	Swamp Eel	PGC development/genomic editing	qRT–PCR/morpholinos/CRISPR/Cas9 design	PGCs	Dnd is crucial for PGC survival and migration/potential for generating mutants by CRISPR/Cas9	(42)
Melanotaenia fluviatilis	Australian Rainbowfish	Cryopreservation/flow cytometry	Histology/flow cytometry	Oogonia	Ovarian tissue cryopreservation/enrichment of oogonia by flow cytometry	(21)
Gnathopogon caerulescens	Honmoroko	Cryopreservation	Immunohistochemistry/cell culture	Spermatogonia/oogonia	Successful vitrification of spermatogonia and oogonia/development in vitro to spermatids and oocytes	(20)
Oryzias latipes	Medaka	PGC development	In situ hybridization/immunohistochemistry/transgenesis	PGCs	Identification of mutants in CXCR4b and CXCR7 receptors affecting PGC migration differentially	(43)
Paralichthys olivaceus	Japanese Flounder	Reproductive sterilization	Histology/qPCR/in situ hybridization	Spermatogonia/oogonia	Busulfan-induced sex-dependent gonadal disruption/transformation of spermatogonia into somatic cells	(28)

Takifugu bimaculatus	Blowfish	Cell culture/genomic editing	RT–PCR/transfection/cytotoxicity assays/CRISPR/Cas9	Ovarian cells	Establishment of ovarian cell line/preliminary PSTBP2 knockout by CRISPR/Cas9	(44)
Acipenser sinensis/A. dabryanus	Chinese Sturgeon/Dabry's Sturgeon	Germ cell transplantation	Immunohistochemistry/fluorescence microscopy/nuclear diameter measurement	Spermatogonia/oogonia	Colonization of transplanted germ cells in recipients/first step toward producing Chinese sturgeon gametes by surrogate recipients	(24)
Thunnus orientalis	Pacific Bluefin Tuna	Germ cell transplantation	Histology/immunohistochemistry/flow cytometry/in situ hybridization	Type A spermatogonia	Enrichment of type A spermatogonia by light scatter properties in flow cytometry/potential for transplants	(32)
Oncorhynchus mykiss/O. masou/Salvelinus fontinalis/Salmo trutta/Danio rerio	Rainbow Trout/Masou Salmon/Brook Trout/Brown Trout/Zebrafish	Transgenesis/germ cell transplantation	Chimeric RNA microinjection/fluorescence microscopy	PGCs	Non transgenic labeling of PGCs with GFP-vasa 3'UTR for visualization and transplantation in salmonids	(11)
Cyprinus carpio	Common Carp	Reproductive sterilization	Histology/qRT–PCR	Spermatogonia/oogonia	Combined treatment of busulfan and high temperature induced gonadal sterility in adults as preparation for transplants	(45)
Danio rerio	Zebrafish	PGC development	Immunohistochemistry/in situ hybridization/transgenesis/TUNEL assays	PGCs	Heparan sulfate glycosaminoglycans are necessary for proper migration and survival of PGCs	(46)
Scophthalmus maximus	Turbot	Germ cell molecular marker	RT–PCR/qPCR/in situ hybridization	Type A spermatogonia	Ly75 is a specific marker for type A spermatogonia/potential for isolating and transplanting these cells	(47)

Pelteobagrus fulvidraco	Yellow Catfish	PGC development/sex determination	Chimeric mRNA microinjection/fluorescence microscopy/PGC counting	PGCs	XX female embryos have more PGCs than XY males at 48 hpf/suggesting influence in sex determination	(48)
Anoplopoma fimbria	Black Flounder	Gonadal development/sex determination	Histology/qPCR/ELISA	Oocytes/germ cells	High temperature inhibited ovarian development and caused sex reversal to males in some genotypic females	(49)
Salmo caspius/Oncorhynchus mykiss	Caspian Trout/Triploid Rainbow Trout	Germ cell transplantation	RT–PCR/qRT–PCR/immunocytochemistry/fluorescent labeling/DNA mitochondrial analysis	Type A spermatogonia	Isolation/in vitro culture and transplantation of type A spermatogonia/colonization and survival in triploid recipients	(34)
Labeo rohita	Rohu Carp	In vitro germ cell culture	Ficoll separation/MACS/immunocytochemistry/qRT–PCR/BrdU staining	Spermatogonia	Enrichment of spermatogonia by MACS/short-term culture maintaining undifferentiated state	(50)
Cynoglossus semilaevis	Half-Spotted Flounder	Germ cell molecular marker/sex determination	Cloning and sequencing/qPCR/chimeric mRNA microinjection	PGCs	Characterization of vasa and its 3'UTR/sexual dimorphic expression during gonadal development and differentiation	(19)
Danio rerio	Zebrafish	Cryopreservation/germ cell transplantation	Freezing and vitrification optimization/transplantation/histology/progeny testing	Spermatogonia	Testicular and spermatogonia cryopreservation/regeneration of zebrafish lines by transplantation	(22)
Nibea mitsukurii/Pennahia argentata	Bluefish/White Croaker	Germ cell transplantation/triploidization	Flow cytometry/PCR genotyping/histology/RT–PCR	Oogonia	Oogonia transplantation in hybrid triploid recipients lacking germ cells/egg production derived from donor	(17)

Paralichthys olivaceus	Japanese Flounder	Germ cell transplantation	Germ cell depletion by busulfan/isolation and labeling of oogonia/microsatellite genotyping	Oogonia	Oogonia transplantation in adult male recipients depleted of germ cells/production of offspring derived from donor	(23)
Nibea albiflora	Yellow Croaker	Cryopreservation/transgenesis	qRT–PCR/immunohistochemistry/transmission electron microscopy	Germ cells	Production of sterile triploid fish as potential recipients for germ cell transplantation and transgenesis	(51)
Ictalurus punctatus	Channel Catfish	Reproductive sterilization/transgenesis	qRT–PCR/PCR	PGCs	Generation of copper-sensitive constructs for knockdown of PGC genes and repressible transgenic sterilization	(13)
Pagrus major/Oryzias latipes	Japanese Sea Bream/Medaka	Transgenesis	Chimeric mRNA microinjection/transgenesis with vasa promoter and 3'UTR/fluorescence microscopy	PGCs/germ cells	Transient marking of PGCs with pargo vasa 3'UTR/generation of stable medaka transgenic line with pargo vasa	(27)
Danio rerio	Zebrafish	Gonadal development/sex determination	RT–PCR/transgenic reporter lines/histology	Germ cells	Sexually dimorphic expression of vasa splicing variants during gonadal differentiation/fluorescence patterns allow early sex determination	(18)
Ictalurus punctatus	Channel Catfish	Reproductive sterilization/transgenesis	qRT–PCR/spawning rate analysis	PGCs	RNAi constructs and overexpression of PGC genes induced copper-repressible transgenic sterilization	(52)

Table 4. Summary of important findings and implications for each biotechnological application based on vasa expression in teleost fish

Biotechnological Application	Key Findings	Implications and Future Perspectives
Germ Cell Cryopreservation	Vasa as a marker for survival of germ cells cryopreservation Optimized protocols for spermatogonia, oogonia, and gonadal tissue in various species	Establishment of germplasm banks for the conservation of genetic resources Need to adapt protocols to species of regional interest or those threatened
Germ Cell Transplantation	Efficient isolation and purification of PGCs, spermatogonia, and oogonia based on vasa expression. Colonization and functional differentiation of transplanted germ cells in sterile or cross-species recipients	Potential to regenerate complete genetic lines and produce gametes of threatened species through surrogate breeders Need to optimize donor-receptor reproductive synchronization and explore new interspecific combinations
Germ Cell-Mediated Transgenesis	Use of vasa regulatory regions to direct specific transgenic expression in germ cells Generation of stable transgenic lines and knockout models as recipients for transplants	Facilitation of in vivo functional studies and analysis of specific germ line expression patterns Potential to produce genetically modified gametes and sterile fish in aquaculture
Reproductive Sterilization	Vasa as an indicator of the effectiveness of sterilization strategies (gene silencing, genomic editing, chemical treatments) Generation of sterile models through knockout of key genes for germ cells (vasa, dnd)	Applications in the production of reproductive populations in aquaculture and generation of sterile recipients for transplants Need to evaluate specificity, efficiency, and potential pleiotropic effects of each strategy
Sex Determination and Differentiation	Sexually dimorphic expression patterns of vasa during gonadal development in various species Correlation between the number of vasa-positive PGCs and sexual determination in some species	Potential use of vasa as an early biomarker of differentiation and sexual determination Contribution to understanding the underlying molecular mechanisms of sexual determination in teleost's

CAPÍTULO III

Vasa expression correlates with spermatogonia abundance across reproductive phases in Amazonian characids: implications for germplasm cryopreservation

Artigo elaborado seguindo modelo de estrutura e formatação do periódico *Animal Reproduction*

Manuscript Title: *Vasa* expression correlates with spermatogonia abundance across reproductive phases in Amazonian characids: implications for germplasm cryopreservation

Enrique Garcia-Candela[1,2,3], Milagros Cabrera-Soregui[1,2], Aaron Mondragón-Martínez[4], Fernanda de Mello[1]; Danilo Pedro Streit Jr[1, 5]

[1] AQUAM Research Group, Animal Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

[2] CITE productivo San Martín, Instituto Tecnológico de la Producción, San Martín, Peru.

[3] Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Peru.

[4] Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú.

[5] Veterinary Science Research Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Correspondence: Danilo Pedro Streit Jr[1] (danilo.streit@ufrgs.br)

Abstract

This study investigated reproductive phase-dependent expression patterns of the *vasa* gene in two economically important Amazonian fish species: *Colossoma macropomum* (tambaqui) and *Piaractus brachypomus* (pirapitinga). Histological analysis and qPCR were performed on specimens classified into different reproductive phases to characterize testicular development and *vasa* expression profiles. Fold change analysis demonstrated strictly gonad-specific expression of *vasa* in both species, confirming its utility as a molecular marker for germ cell identification. Reproductive phase-dependent expression patterns revealed significant differences among phases ($p < 0.001$) that directly correlated with spermatogonia abundance. In *C. macropomum*, *vasa* expression followed the pattern regenerating > immature late > immature early ($F = 19.54$, $p < 0.001$), while *P. brachypomus* showed regenerating > immature > early spawning capable > late spawning capable ($F = 46.88$, $p < 0.001$). Expression levels were comparable between species when comparing equivalent reproductive phases. Molecular sequencing confirmed high identity between *C. macropomum* sequences and reference databases (100% identity), while *P. brachypomus* showed high similarity (98.85-98.92% identity) to related characid species. Regenerating phases showed highest *vasa* expression in both species, providing clear molecular criteria for optimal donor selection in germplasm conservation applications.

Keywords: Germline markers, spermatogenesis, characiformes, DEAD-box proteins, reproductive biotechnology.

Introduction

The preservation of genetic diversity in fish is a crucial challenge to ensure the sustainability of aquaculture and protect species at risk of extinction. The tambaqui (*Colossoma macropomum*) and the pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) are two economically significant species for aquaculture in the Amazon, with their intense production having markedly escalated in recent decades (Tafur-Gonzales et al. 2009; Val and de Oliveira 2021).

The intensification of production via systems utilizing a restricted number of broodstock, without long-term genetic replenishment strategies, risks diminishing genetic variability and diversity of stocks in the medium to long term (Lopera-Barrero 2009; Gonçalves et al. 2019). The decline in variety adversely impacts production metrics, larval viability, disease resistance, and environmental adaptability (Santos et al. 2016; María Doris Escobar et al. 2022).

In this context, the conservation of spermatogonia or immature germ cells through cryopreservation emerges as an alternative to preserve the genetic material of economically relevant stocks currently in production (Lacerda et al. 2010; Gallego et al. 2017). However, the large-scale application of these techniques first requires determining the best source and timing for germ cell collection during spermatogenesis.

While histological characterization allows for a detailed description of testicular structure and cell types (Schulz et al. 2010), it must be complemented with specific molecular markers of the germline associated with each stage of development. In this regard, the *vasa* gene has been demonstrated to be a specific marker of germ cells in a wide range of organisms (Liang et al. 1994; Raz 2000).

The *vasa* gene encodes an ATP-dependent RNA helicase belonging to the DEAD-box family, which is specifically expressed in primordial germ cells and plays a crucial role in germline determination and gametogenesis (Vasconcelos et al. 2019a). In teleost fish, *vasa* is involved in spermatogenesis regulation, exhibiting specific expression patterns associated with different stages of gonadal maturation (Hartung et al. 2014).

Additionally, *vasa* expression is closely correlated with spermatogonia abundance across different reproductive phases. According to (Brown-Peterson et al. 2011), reproductive phases characterized by proliferating type A spermatogonia (immature

and regenerating phases) show highest *vasa* expression, while phases with active spermatogenesis and cellular differentiation toward spermatocytes and spermatids (developing and spawning capable phases) exhibit lower expression levels.

Characterizing *vasa* gene expression across reproductive phases, as defined by (Brown-Peterson et al. 2011), allows for the identification of optimal timing for germ cell collection by correlating molecular markers with histological evidence of spermatogonia abundance. This integrated approach facilitates reproductive biotechnologies such as germplasm cryopreservation and cell transplantation by providing both molecular and morphological criteria for donor selection. Previous studies in other teleost species have demonstrated specific expression patterns during gametogenesis, with variations associated with reproductive phases and developmental stages (Ye et al. 2017; Xu et al. 2020), emphasizing the importance of understanding phase-specific expression patterns for conservation applications.

The present study examines key aspects of spermatogenesis in *C. macropomum* and *P. brachypomus*—two phylogenetically related species within the subfamily *Colossominae*—through histological analysis and *vasa* gene expression profiling by qPCR. The goal is to identify the best source and timing for spermatogonia collection for conservation purposes in these regionally important aquaculture species.

Methodology

Ethics statement

The current study was performed according to the regulations of the Administrative Panel on Laboratory Animal Care and Use at Universidad Científica del Sur, and it was carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (protocol number 007-CIEI-AB-CIENTIFICA-2023).

Specimen selection and sample collection

Male specimens of *C. macropomum* and *P. brachypomus* were collected from breeding units in the San Martín and Loreto regions of Peru. Specimens were classified into reproductive phases based on histological criteria following Brown-Peterson et al. (2011). Sample sizes consisted of: (1) *C. macropomum* - immature early (n=6), (2) immature late (n=5), and (3) regenerating (n=5); (1) *P. brachypomus* - immature (n=4),

(2) early spawning capable (n=6), (3) late spawning capable (n=7), and (4) regenerating (n=4).

Morphometric measurements and gonadosomatic index (GSI) calculations were performed for all specimens, with data presented as mean ± standard deviation (SD) per reproductive phase (**Table 1**).

Following euthanasia with 5% eugenol, testes were dissected and divided into portions for dual processing: (1) histological examination using Bouin's solution fixation (24h, room temperature), and (2) molecular analysis using RNA stabilization reagent (RNA-Be-Locked, BioBasic, Canada) preservation at -20°C. The same individuals provided tissue for both analytical approaches (sample sizes as indicated in Table 1).

The relative abundance of target cDNA within the sample set was calculated from a serial dilution (1:1–1:125) (standard curve) of cDNA pooled from 7 different tissues (brain, liver, muscle, kidney, spleen, gut, and gonad) were collected from three adult specimens (5 years) of each species. These tissue samples were similarly preserved in RNA-Be-Locked reagent and stored at -20°C until RNA extraction and gene expression analysis.

Histological analysis of the gonads

Tissue processing

Testicular samples were processed using a standardized approach. Tissues were fixed in Bouin's solution for at least 24 hours at room temperature, then dehydrated through an ascending series of ethanol concentrations (70%, 80%, 90%, 95%, and 100%) and cleared in xylene. Samples were embedded in paraffin (Leica, Germany) using a HistoCore Arcadia embedding station (Leica, Germany). Sections were cut at 3 µm thickness using a HistoCore AUTOCUT rotary microtome (Leica, Germany) and stained with hematoxylin and eosin using a Leica ST5010 Autostainer XL (Leica, Germany).

Histological assessment

Testicular samples were classified into reproductive phases following standardized reproductive phase terminology. The immature phase was characterized by the presence of only primary spermatogonia (Sg1) with sparse and poorly developed seminiferous tubules and no lumen in lobules. The developing phase was identified by

the presence of spermatocysts containing all stages of spermatogenesis (Sg2, Sc1, Sc2, St, and Sz) within spermatocysts, but with no Sz present in the lumen of lobules or sperm ducts, indicating gonadotropin-dependent gamete development. The spawning capable phase was defined by the presence of Sz in the lumen of lobules and/or sperm ducts with all stages of spermatogenesis present, indicating reproductive competence within the current cycle. The regressing phase was characterized by little to no active spermatogenesis, depleted stores of Sz in sperm ducts and lobules, and few scattered spermatocysts containing primarily late-stage germ cells. The regenerating phase was identified by proliferation of spermatogonia throughout testes with no spermatocysts present in lobules and continuous germinal epithelium, representing sexually mature but reproductively inactive individuals.

Vasa Gene Expression Analysis

RNA Extraction, Quality Assessment, and cDNA Synthesis

Total RNA was isolated from different tissue samples and gonads from various reproductive phases using the Direct-zol RNA Miniprep Kit (Zymo, USA), following the manufacturer's instructions. RNA quality and concentration were assessed using the Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) with the QuantiFluor® RNA system (Promega, USA). Samples with concentrations greater than 100 ng/µL were considered high quality.

cDNA synthesis was performed using the qScript® cDNA SuperMix (Quantabio, USA) in 20 µl reactions containing 4 µl of 5X SuperMix and 40 ng of RNA template. Reactions were incubated at 25°C for 5 minutes, 42°C for 30 minutes, and 85°C for 5 minutes, according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was stored at -20°C until use.

Primer Design and Efficiency Determination

Primers for *vasa* and *β-actin* genes were designed using the Integrated DNA Technologies platform (https://www.idtdna.com/pages) based on *Colossoma macropomum* sequences deposited in GenBank (*vasa*: MF966151.2; *β-actin*: KX444555.1) **(Table 2)**. Due to the close phylogenetic relationship within the subfamily *Colossominae*, these primers were also applied for *Piaractus brachypomus* analysis.

Primer specificity was evaluated through melting curve analysis using PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix (Quantabio, USA) in a Q thermocycler (Quantabio, USA). The thermal profile consisted of 45 cycles at 51°C hybridization temperature, followed by incremental temperature increases (0.3°C steps) from 60°C to 95°C for dissociation curve generation.

For quantitative accuracy assessment, amplification efficiency was determined using the standard curve method with five serial 1:10 cDNA dilutions. Efficiency values were calculated according to the formula **E=10^(-1/slope)**, with acceptable performance defined as slopes between -4 and -2.7, in accordance with Pfaffl method parameters.

Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

qPCR reactions were performed in a final volume of 25 µl in triplicate, containing 12.5 µl of PerfeCTa SYBR Green SuperMix (Quantabio, USA), 0.5 µl of each specific primer (10 µM), 2 µl of cDNA template (corresponding to 100 ng of cDNA), and 9.5 µl of ultrapure water.

The amplification program consisted of an initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of: denaturation at 95°C (15 seconds), annealing at 51°C (30 seconds), and extension at 72°C (30 seconds) with data acquisition. A final melting curve analysis was performed from 60°C to 95°C (0.3°C increments).

Relative Expression Analysis of the vasa Gene

Two complementary approaches were employed to characterize *vasa* gene expression patterns: tissue distribution analysis to determine gene specificity and reproductive phase-dependent expression profiling in testicular tissue. For tissue specificity assessment, three individuals from each species showing consistent *β-actin* amplification performance were selected to minimize technical variability. Fold change analysis was performed to quantify *vasa* expression across seven different tissues (brain, liver, muscle, kidney, spleen, gut, and gonad). Expression data were normalized using the equation E^(-ΔCt), where E represents primer efficiency and ΔCt is the difference between *vasa* and *β-actin* threshold cycles. The Pfaffl method was applied for relative quantification, with gonadal tissue serving as the calibrator sample (set to 1.00). For reproductive phase-dependent expression analysis, *vasa* transcript levels were compared among all specimens from the different reproductive phases described

above. Expression data were normalized to *β-actin* using the Pfaffl method. Normalized expression values were analyzed to evaluate differences in *vasa* expression across reproductive phases.

Sequencing and Bioinformatic Analysis

PCR products of the *vasa* gene were purified using DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo, USA) and sequenced with Oxford Nanopore Technologies (ONT) using a Flongle flow cell (FLO-FLG114). Samples were barcoded with the Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK114-24). Raw data were processed with Dorado v7.6.8 for basecalling and demultiplexing, then filtered for quality (Q ≥ 10) and read length (≥ 50 bp) using SeqKit (https://github.com/shenwei356/seqkit). The filtered reads were mapped to the reference sequence (MF966151.2) using Minimap2 (Li 2018). Alignment files were processed with Samtools version 1.21 (Li et al. 2009), and consensus sequences were generated using Medaka version 2.0.1 (https://github.com/nanoporetech/medaka). The final consensus sequences were compared against the NCBI database using BLAST to identify sequences with the highest similarity.

Statistical Analysis

The relative expression of the *vasa* gene among reproductive phases was analyzed using one-way ANOVA after verifying normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Levene's test). In cases of non-normality, the Kruskal-Wallis test was applied. For multiple comparisons, results are presented using letter notation, where different letters indicate statistically significant differences between groups ($p < 0.05$). Data are presented as mean ± standard deviation (SD), with significance set at $p < 0.05$. Tissue specificity analysis employed a qualitative detection/non-detection approach using fold change analysis. All analyses were conducted using R software (version 4.1.0).

Results

Histological characterization of testicular reproductive phases

Histological examination revealed distinct structural characteristics corresponding to different reproductive phases in both *C. macropomum* and *P. brachypomus*. In *C. macropomum*, early immature testes were characterized by minimal germ cell content with prominent blood vessels and very few scattered primary spermatogonia (Sg1)

within poorly organized testicular tissue (Figure 1A). Late immature testes displayed well-defined primary spermatogonia organized in primitive spermatocysts with established lobular architecture and continuous germinal epithelium (Figure 1B). Regenerating testes showed organized lobular structure with clear lumina and extensive spermatogonial proliferation in peripheral spermatocysts containing spermatogonia (Sg1, Sg2) and spermatocytes (Sc1, Sc2), but no free spermatozoa in lumina (Figure 1C, D). In *P. brachypomus*, immature testes exhibited minimal germ cell content with scattered primary spermatogonia within poorly organized tissue and prominent vascularization (Figure 1E). Regenerating testes displayed well-organized lobular architecture with active spermatogonial proliferation in spermatocysts and continuous germinal epithelium throughout (Figure 1F). Early spawning capable testes showed intermediate development with some spermatocysts containing advanced germ cells (Figure 1G). Late spawning capable testes were characterized by mature lobular structure with abundant free spermatozoa (Sz) in lumina and sperm ducts (Figure 1H). No free spermatozoa were observed in the lumina of immature or regenerating specimens in either species.

Tissue-specific expression of *vasa* gene

Fold change analysis revealed strictly gonad-specific *vasa* expression in both species (Figure 2). In both species, *vasa* expression was exclusively detected in gonadal tissue, while no expression was observed in any somatic tissues analyzed, including brain, liver, muscle, kidney, spleen, and gut. Both species showed comparable gonadal expression levels relative to their respective somatic tissues, confirming the gonad-specific nature of *vasa* expression across *Colossominae* species.

Reproductive phase-dependent expression of *vasa* gene

Expression analysis revealed significant differences in *vasa* gene expression among reproductive phases in both species. In *P. brachypomus*, expression was highest in the regenerating phase, showing 52.3 times higher expression than late spawning capable phase (0.00157 ± 0.00053 vs 0.00003 ± 0.00001), 1.7 times higher than immature phase (0.00095 ± 0.00011), and 7.5 times higher than early spawning capable phase (0.00021 ± 0.00006). Significant differences were detected among phases ($F = 46.88$, $p < 0.001$). The regenerating phase differed significantly from all other phases, immature phase differed significantly from both spawning capable

phases, while early and late spawning capable phases did not differ significantly from each other (Figure 4).

In *C. macropomum*, expression was highest in the regenerating phase, showing 19.2 times higher expression than early immature phase (0.00365 ± 0.00156 vs 0.00019 ± 0.00008) and 2.7 times higher than late immature phase (0.00133 ± 0.00034). Significant differences were revealed among phases ($F = 19.54$, $p < 0.001$). The regenerating phase showed significantly higher expression than both immature phases, while early and late immature phases did not differ significantly from each other (Figure 3). Coefficients of variation within reproductive phases ranged from 12-43% across both species.

Vasa gene sequencing

ONT sequencing generated approximately 4,050 reads (4.25 megabases) across four barcoded samples, with barcodes 01-02 representing *P. brachypomus* and 03-04 corresponding to *C. macropomum*. The N50 read length reached 202 bases with 99.8% successful base calling. After quality filtering (Q10), 1,340 reads (296.69 kilobases) remained for analysis, with representation varying by barcode: *C. macropomum* samples showed higher coverage (0.89 and 0.70 kilobases for barcodes 03 and 04, respectively) compared to *P. brachypomus* (0.62 and 0.38 kilobases for barcodes 01 and 02). BLAST analysis confirmed *C. macropomum* sequences matched the *vasa* gene reference in GenBank (MF966151.2) with 100% identity, while *P. brachypomus* sequences showed highest similarity (98.85-98.92% identity) to DEAD-box polypeptide 4 (*DDX4*) genes from related characid species, particularly *Pygocentrus nattereri*.

Discussion

Histological analyses revealed structural differences among the reproductive phases studied, with distinctive characteristics corresponding to different stages of testicular development. Individuals in the immature phase showed sparse and poorly developed seminiferous tubules with limited presence of type A spermatogonia, while specimens in developing phases presented larger diameter and clearly defined tubules. This progression of testicular development agrees with what was documented by Schulz et al. (2010) for teleosts.

The histological characteristics observed are consistent with standardized reproductive phase classification (Brown-Peterson et al. 2011). During immature phases, cellular activity in gonads was relatively quiescent, with few scattered primordial germ cells in gonadal tissue. As development progressed, spermatogonial proliferation and formation of germinal cysts became evident, presenting germ cells in well-formed seminiferous tubules. The dynamic nature of cellular composition throughout the reproductive cycle correlates directly with the *vasa* expression patterns observed, demonstrating the utility of *vasa* as a biomarker for reproductive phase identification.

Fold change analysis demonstrated strictly gonad-specific *vasa* expression in both species, confirming its utility as an exclusive molecular marker for germ cells. This tissue specificity is consistent with previous studies in other teleosts such as zebrafish, medaka, and tilapia (Kobayashi et al. 2000; Vasconcelos et al. 2019b). Vasconcelos et al. (2019a) had already demonstrated the specificity of *vasa* expression in *C. macropomum* gonads using RT-PCR, and our study extends these findings to *P. brachypomus* using RT-qPCR, which allowed for more precise quantification. Expression levels were generally comparable between species when comparing equivalent reproductive phases, with *C. macropomum* showing slightly higher expression in immature phase, while *P. brachypomus* showed higher expression in the regenerating phase, suggesting species-specific patterns in phase-dependent regulation of *vasa* expression.

The reproductive phase-dependent expression profile revealed patterns that directly reflect spermatogonia abundance. In *C. macropomum*, the pattern regenerating > immature late > immature early reflects the progressive accumulation of spermatogonial proliferation capacity, with highest expression during active gonadal recrudescence in sexually mature individuals, intermediate expression in late immature stages with increased spermatogonial organization, and lowest expression in early immature stages with minimal germ cell content. Similarly, in *P. brachypomus*, the pattern regenerating > immature > early spawning capable > late spawning capable demonstrates the relationship between *vasa* expression and spermatogonial proliferation, as regenerating phases are characterized by abundant spermatogonial activity according to Brown-Peterson et al. (2011).

The variability observed within reproductive phases (CV: 12-43%) reflects the biological reality that reproductive phases represent broad developmental categories rather than discrete cellular states, as recognized by Brown-Peterson et al. (2011). Specimens naturally occurred at different developmental sub-stages within each major reproductive phase, resulting in the observed intra-phase heterogeneity. This intra-phase variability is comparable to that reported in other gene expression studies in fish. For example, Mu et al. (2013) documented similar inter-individual variation in *vasa* expression during the reproductive cycle of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*), and in studies with snakeskin gourami, equivalent variability ranges were documented in germline gene expression during larval development (as shown in the qPCR figures from our project knowledge). Despite this intra-phase variability, statistically significant differences were maintained between phases ($p < 0.001$), confirming robust and biologically meaningful patterns.

Similar phase-dependent *vasa* expression patterns have been reported in other teleost species. In Atlantic cod (*Gadus morhua*), Presslauer et al. (2012) demonstrated that *vasa* expression was strongly expressed throughout primordial germ cell development and showed tissue-specific expression in gonads. Similarly, in snakeskin gourami (*Trichopodus pectoralis*), ddx4 (*vasa* homolog) showed highest expression during early gonadal development phases with decreased expression as gametogenesis progressed toward mature stages, consistent with our findings in *Colossominae* species (Yoshizaki et al. 2000). Additionally, similar developmental stage-specific regulation patterns have been documented in Pacific bluefin tuna (Nagasawa et al. 2009). The expression patterns we observed align with the Korean rockfish studies, where *vasa* expression varied significantly during different reproductive phases, with higher expression associated with spermatogonial proliferation phases (Mu et al. 2013).

Our study provides molecular validation of standardized reproductive phase classification through *vasa* expression analysis. The correspondence between molecular markers and histological findings provides robust evidence for the biological relevance of these standardized phases.The higher expression of *vasa* in phases dominated by spermatogonia (immature and regenerating) compared to phases characterized by cellular differentiation (developing and spawning capable) confirms the functional relationship between *vasa* expression and spermatogenic potential,

similar to findings reported by Hartung et al. (2014) and Xu et al. (2020) in other teleost species. Similar functional relationships have been confirmed in multiple teleost species including Japanese sea bass (Chi et al. 2015) and Nile tilapia (Melo et al. 2019).

The comparative analysis between species revealed interesting differences in phase-specific expression patterns. While both species demonstrated the expected correlation between *vasa* expression and spermatogonial abundance, the specific expression levels varied between phases, with *C. macropomum* showing a clear ontogenetic progression from immature early through immature late to regenerating phases, while *P. brachypomus* showed elevated expression in both regenerating and immature phases compared to spawning capable phases.

Our sequencing analysis of the *vasa* gene provided additional molecular evidence supporting the comparative findings between *C. macropomum* and *P. brachypomus*. The ONT sequencing confirmed 100% identity between our *C. macropomum* samples and the previously reported *vasa* sequence (GenBank no. MF966151.2), validating the reliability of our molecular analyses. Interestingly, *P. brachypomus* sequences showed highest similarity (98.85-98.92% identity) to DEAD-box polypeptide 4 (*DDX4*) genes from *Pygocentrus nattereri*, a phylogenetically related characid species. This high sequence similarity across characid fishes aligns with Vasconcelos et al. (2019a), who demonstrated that the *vasa* gene (which encodes the *DDX4* protein) is highly conserved throughout vertebrate evolution. The slight genetic differences between the two species studied may partially explain the quantitative expression differences observed in our qPCR analysis. As noted by Vasconcelos et al. (2019b) in their work on alternatively spliced transcripts in *C. macropomum*, even closely related species can exhibit substantial differences in regulatory mechanisms that affect gene expression levels. These molecular distinctions warrant further investigation, particularly regarding potential *cis*-regulatory elements or species-specific post-transcriptional regulation mechanisms that may influence *vasa* expression.

From a practical perspective, our results have important implications for developing genetic resource conservation strategies. The identification of immature and regenerating phases as having highest *vasa* expression and spermatogonial abundance provides clear molecular and histological criteria for optimal donor

selection. While these phases theoretically represent the best sources for germ cell collection, practical considerations such as specimen availability, handling requirements, and cost-effectiveness must also be evaluated. Immature specimens present significant advantages in terms of handling, availability, and cost. They are considerably easier to acquire from commercial fish farmers, who are generally more willing to provide young specimens than adult breeders (Woynarovich and Anrooy 2019). Additionally, the experimental handling of smaller fish reduces infrastructure requirements and operational costs.

Considering that modern cell isolation and enrichment techniques can partially compensate for quantitative differences in cell density (Lacerda et al. 2010; Gallego et al. 2017), the use of specimens from phases with detectable *vasa* expression and viable spermatogonia could represent a reasonable compromise between biological efficiency and practical viability. This consideration is particularly relevant in the context of Amazonian aquaculture, where access to specimens in specific reproductive phases may be limited and costly.

The high similarity in *vasa* expression patterns between the two species studied suggests that similar protocols could be developed for both, simplifying the practical implementation of conservation strategies. This phenotypic convergence is consistent with the close phylogenetic relationship between these species within the *Colossominae* subfamily and could extend to other related species important for aquaculture, such as *P. mesopotamicus*, thus optimizing resources allocated to genetic conservation programs (Gonçalves et al. 2019). The characterization of phase-specific *vasa* expression patterns, as defined by Brown-Peterson et al. (2011), allows for the identification of optimal timing for germ cell collection by correlating molecular markers with histological evidence of spermatogonia abundance, facilitating reproductive biotechnologies such as germplasm cryopreservation and cell transplantation by providing both molecular and morphological criteria for donor selection.

Conclusion

This study establishes *vasa* as a reliable germline marker in *C. macropomum and P. brachypomus*, with expression patterns reflecting spermatogonia abundance across reproductive phases. These findings provide molecular criteria for optimal donor selection in germplasm conservation applications and establish baseline data for

implementing reproductive biotechnologies in these economically important Amazonian aquaculture species.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Centro de Innovación Tecnológica Productivo San Martín (CITE Productivo San Martín) for providing facilities and technical support to conduct this research. We are grateful to the aquaculture producers who supplied the fish specimens used in this study. Special thanks to the laboratory technicians who assisted with sample processing and histological preparations.

Author contributions

E.G.C.: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing (original draft, review, editing), Visualization, Project administration, Funding acquisition. M.C.S.: Investigation, Formal analysis. A.M.M.: Formal analysis, Data curation.. F.d.M.: Writing (review and editing), Supervision. D.P.S.J.: Conceptualization, Resources, Writing (review and editing) and Supervision.

Funding

This work was funded by the own resources of the AQUAM Research Group (UFRGS) and the CITE productive San Martín (ITP).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, et al (2011) A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. Mar Coast Fish 3:52–70. https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555724

Chi M, Wen H, Ni M, et al (2015) The characteristics of *vasa* gene from Japanese sea bass (Lateolabrax japonicas) and its response to the external hormones. J

Ocean Univ China 14:717–723. https://doi.org/10.1007/S11802-015-2550-Z/METRICS

Gallego V, Cavalcante SS, Fujimoto RY, et al (2017) Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). Theriogenology 87:16–24. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.001

Gonçalves RA, Santos CH dos A dos, de Sá Leitão CS, et al (2019) Genetic basis of *Colossoma macropomum* broodstock: Perspectives for an improvement program. J World Aquac Soc 50:633–644. https://doi.org/10.1111/jwas.12564

Hartung O, Forbes MM, Marlow FL (2014) Zebrafish *vasa* is required for germ-cell differentiation and maintenance. Mol Reprod Dev 81:946–961. https://doi.org/10.1002/mrd.22414

Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y (2000) Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, Oreochromis niloticus. Mech Dev 99:139–142. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00464-0

Lacerda SMSN, Batlouni SR, Costa GMJ, et al (2010) A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) Model. PLoS One 5:e10740. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010740

Li H (2018) Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics 34:3094–3100. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191

Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25:2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352

Liang L, Diehl-Jones W, Lasko P (1994) Localization of *vasa* protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. Development 120:1201–1211. https://doi.org/10.1242/dev.120.5.1201

Lopera-Barrero NM (2009) Conservation of Brycon orbignyanus natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model

for species threatened with extinction. Cienc. e Investig. Agrar. 36:191–208

María Doris Escobar L, Farias IP, Hrbek T (2022) Genetic comparison of populations of *Piaractus brachypomus* and P. orinoquensis (Characiformes: Serrasalmidae) of the Amazon and Orinoco basins. Neotrop Ichthyol 20:e220056. https://doi.org/10.1590/1982-0224-2022-0056

Melo LH, Melo RMC, Luz RK, et al (2019) Expression of *Vasa*, Nanos2 and Sox9 during initial testicular development in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) submitted to sex reversal. Reprod Fertil Dev 31:1637–1646. https://doi.org/10.1071/RD18488,

Mu W, Wen H, He F, et al (2013) Cloning and expression analysis of *vasa* during the reproductive cycle of Korean rockfish, Sebastes schlegeli. J Ocean Univ China 12:115–124. https://doi.org/10.1007/S11802-013-1941-2/METRICS

Nagasawa K, Takeuchi Y, Miwa M, et al (2009) cDNA cloning and expression analysis of a *vasa*-like gene in Pacific bluefin tuna Thunnus orientalis. Fish Sci 75:71–79. https://doi.org/10.1007/S12562-008-0021-9/METRICS

Presslauer C, Nagasawa K, Fernandes JMO, Babiak I (2012) Expression of *vasa* and nanos3 during primordial germ cell formation and migration in Atlantic cod (Gadus morhua L.). Theriogenology 78:1262–1277. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.022

Raz E (2000) Minireview The function and regulation of *vasa* -like genes in germ-cell development Erez Raz. Genome Biol 1:1–6. https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017

Santos CHA, Santana GX, Sá Leitão CS, et al (2016) Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellites. Anim Genet 47:373–376. https://doi.org/10.1111/age.12422

Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, et al (2010) Spermatogenesis in fish. Gen Comp Endocrinol 165:390–411. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013

Tafur-Gonzales J, Alcantara-Bocanegra F, Del Águila-Pizarro M, et al (2009) PACO *Piaractus brachypomus* Y GAMITANA *Colossoma macropomum* CRIADOS EN POLICULTIVO CON EL BUJURQUI-TUCUNARÉ, Chaetobranchus

semifasciatus (CICHLIDAE). Folia Amaz 18:97. https://doi.org/10.24841/fa.v18i1-2.336

Val AL, de Oliveira AM (2021) *Colossoma macropomum*—A tropical fish model for biology and aquaculture. J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol. 335:761–770

Vasconcelos ACN, Streit DP, Octavera A, et al (2019a) Isolation and characterization of a germ cell marker in teleost fish *Colossoma macropomum*. Gene 683:54–60. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.027

Vasconcelos ACN, Streit DP, Octavera A, et al (2019b) The germ cell marker dead end reveals alternatively spliced transcripts with dissimilar expression. Sci Rep 9:1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39101-9

Woynarovich A, Anrooy R van (2019) Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816)

Xu D, Yoshino T, De Bello Cioffi M, et al (2020) Production of donor-derived eggs after ovarian germ cell transplantation into the gonads of adult, germ cell-less, triploid hybrid fish. Biol Reprod 103:1289–1299. https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAA168

Ye H, Li CJ, Yue HM, et al (2017) Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon Acipenser sinensis. Theriogenology 94:37–47. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.009

Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, Takeuchi T (2000) Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. Mol Reprod Dev 55:364–371. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<364::AID-MRD2>3.0.CO;2-8,

Table 1. Biometric and reproductive parameters of male *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus* from different reproductive phases.

Species/Phase	n	Age	Length (cm)	Weight (Kg)	Gonad (g)	GSI
CM-EI	6	1 y	37.4 ± 3.0	0.86 ± 0.23	0.05 ± 0.02	0.005 ± 0.002
CM-LI	5	2 y	44.3 ± 2.0	1.92 ± 0.16	0.50 ± 0.04	0.027 ± 0.002
CM-REG	5	5 y	64.3 ± 3.1	6.77 ± 0.25	3.1 ± 0.2	0.045 ± 0.002
PB-IMM	4	1 y	38.0 ± 1.4	1.20 ± 0.08	0.04 ± 0.01	0.003 ± 0.001
PB-ESC	6	4-5 y	44.7 ± 2.5	1.88 ± 0.21	0.20 ± 0.05	0.013 ± 0.003
PB-LSC	7	4-5 y	45.2 ± 2.8	1.95 ± 0.25	0.18 ± 0.04	0.012 ± 0.002
PB-REG	4	5 y	56.0 ± 2.6	5.84 ± 0.42	2.1 ± 0.2	0.039 ± 0.002

Data presented as mean ± standard deviation. Species abbreviations: CM, *Colossoma macropomum*; PB, *Piaractus brachypomus*. Reproductive phases: EI, early immature; LI, late immature; IMM, immature; ESC, early spawning capable; LSC, late spawning capable; REG, regenerating. GSI, Gonadosomatic Index.

Table 2. Primer sequences used for amplification of *vasa* and *β-actin* genes in *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*, including product size.

Genes	Primer Sequences (5′-3′)	Product Size (bp)
Vasa	Forward: GCATGCCTGCTAAAGAAGAAAG Reverse: TCCCACAGCAAGAAACAGATAG	116
β-actin	Forward: ATGAAGATCCTGACCGAGAGA Reverse: TCGAAGTCAAGGGCAACATAG	104

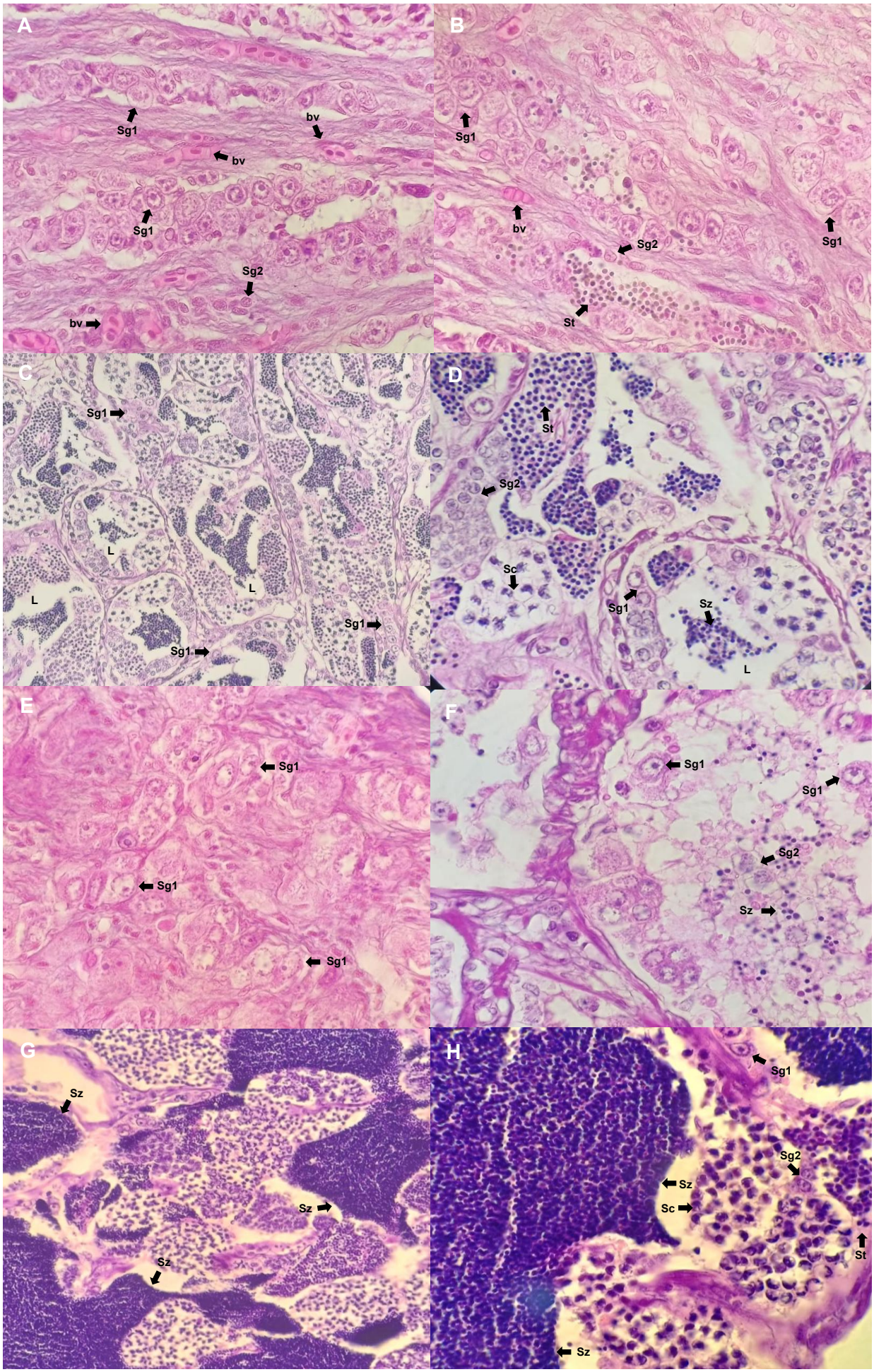
A
Sg1
bv
bv
Sg1
Sg2
bv
B
Sg1
bv
Sg2
Sg1
St
C
Sg1
L
L
L
Sg1
Sg1
D
St
Sg2
Sc
Sg1
Sz
L
E
Sg1
Sg1
Sg1
F
Sg1
Sg1
Sg2
Sz
G
Sz
Sz
Sz
H
Sg1
Sg2
Sz
Sc
St
Sz

Figure 1. Histological characterization of testicular reproductive phases in *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*. **A)** Early immature testis of *C. macropomum* showing minimal germ cell content with prominent blood vessels (bv), primary spermatogonia (Sg1) and very scarce secondary spermatogonia (Sg2) within poorly organized tissue (100×). **B)** Late immature testis of *C. macropomum* with well-defined primary (Sg1) and secondary (Sg2) spermatogonia, and scarce spermatids (St) organized in primitive spermatocysts with established lobular architecture (100×). **C)** Regenerating testis of *C. macropomum* showing organized lobular structure with clear lumina (L) and primary spermatogonia (Sg1) in active proliferation (40×). **D)** Detail of regenerating testis of *C. macropomum* showing primary (Sg1) and secondary (Sg2) spermatogonia, spermatocytes (Sc), spermatids (St) and traces of spermatozoa (Sz) in the tubular lumen (100×). **E)** Immature testis of *P. brachypomus* with minimal germ cell content, showing only primary spermatogonia (Sg1) within poorly organized tissue (100×). **F)** Regenerating testis of *P. brachypomus* showing primary (Sg1) and secondary (Sg2) spermatogonia with traces of spermatozoa (Sz) and well-organized lobular architecture (100×). **G)** Spawning capable testis of *P. brachypomus* showing evident spermatozoa (Sz) in the tubular lumen (40×). **H)** Detail of spawning capable testis of *P. brachypomus* with very scarce primary (Sg1) and secondary (Sg2) spermatogonia, spermatocytes (Sc), spermatids (St) and abundant spermatozoa (Sz) in the tubular lumen (100×). H&E staining.

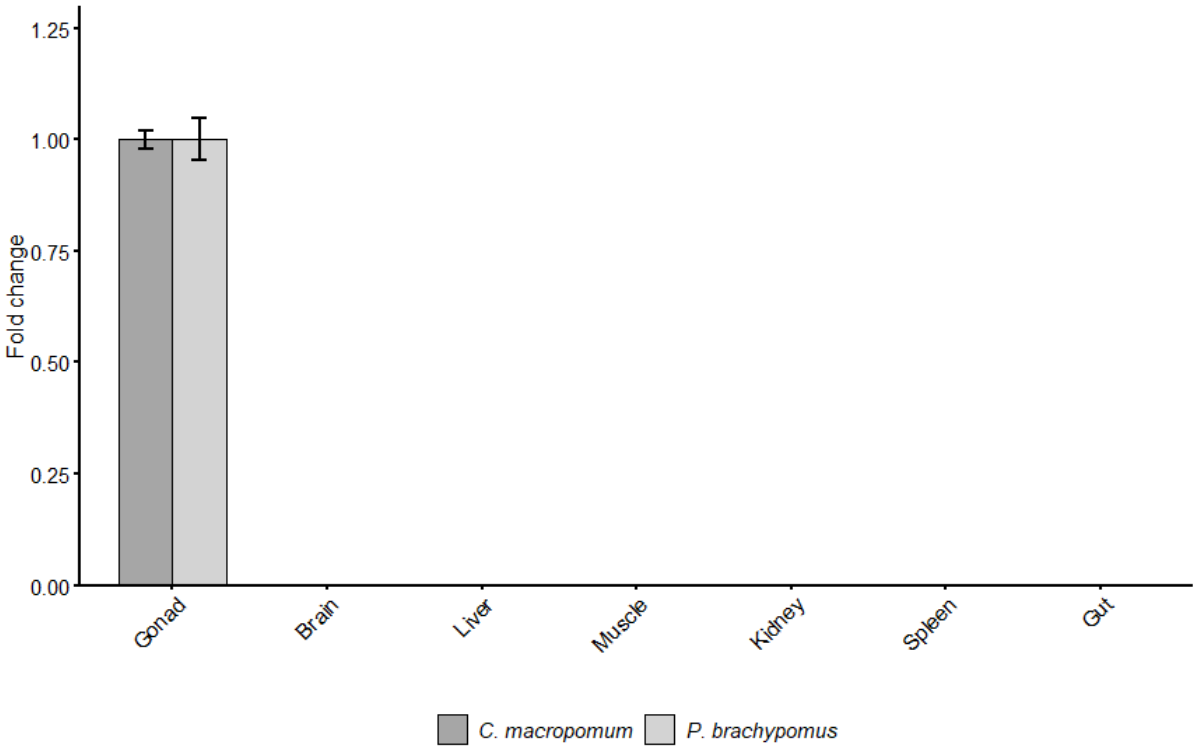

Figure 2. Tissue-specific expression of *vasa* gene in *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*. Fold change analysis showing gonad-specific expression relative to somatic tissues (n=3 per species). Expression was normalized to *β-actin* with gonadal tissue set as 1.0. No detectable expression was observed in any somatic tissue analyzed. Data are presented as mean ± SE.

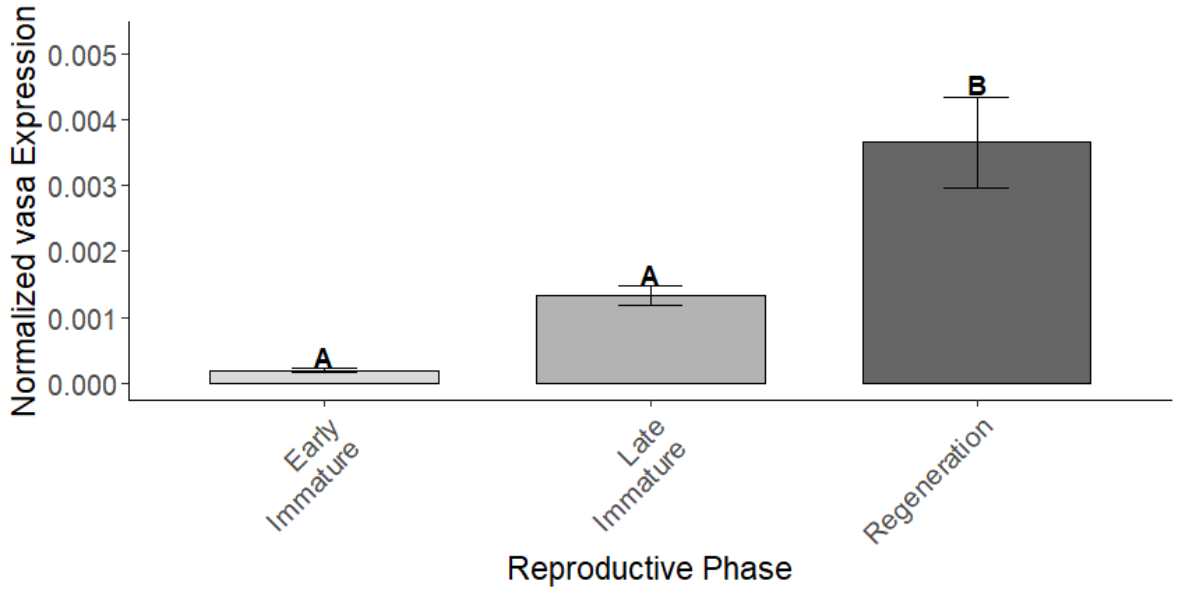

Figure 3. Reproductive phase-dependent expression of *vasa* gene in testes of *Colossoma macropomum*. Bar graph shows mean expression values normalized to *β-actin* (± SE) across different reproductive phases (Immature Early, n=6; Immature Late, n=5; Regenerating, n=5). One-way ANOVA followed by Tukey's range test was performed to rank the treatment groups. Different letters indicate statistically significant differences between phases ($p < 0.05$). ANOVA: $F = 19.54$, $p < 0.001$.

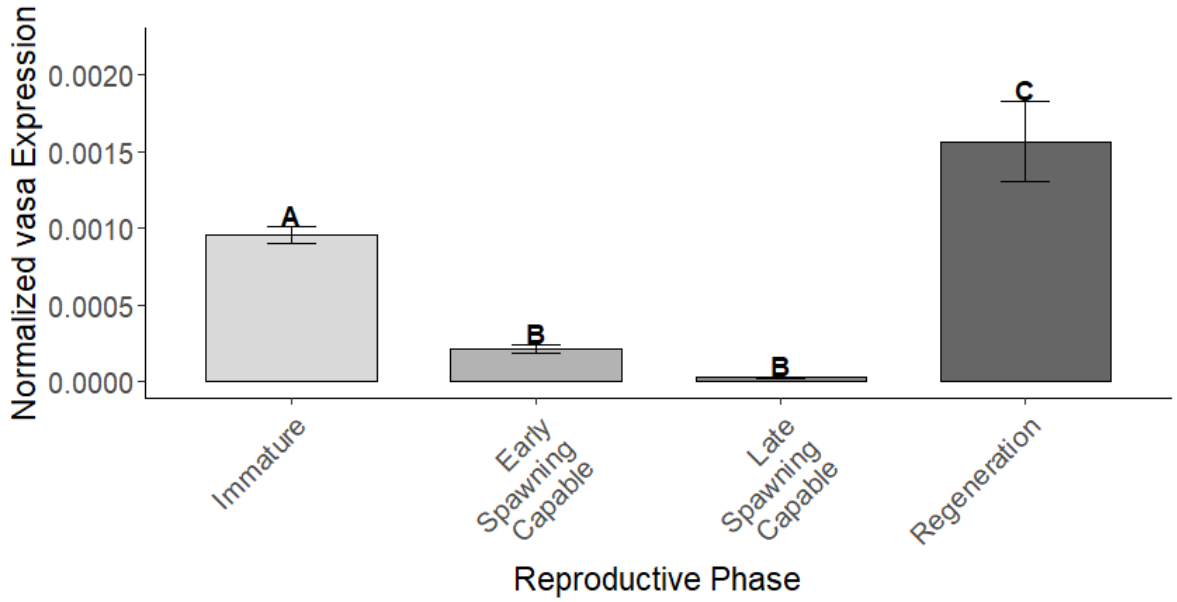

Figure 4. Reproductive phase-dependent expression of *vasa* gene in testes of *Piaractus brachypomus*. Bar graph shows mean expression values normalized to *β-actin* (± SE) across different reproductive phases (Immature, n=4; Early Spawning Capable, n=6; Late Spawning Capable, n=7; Regenerating, n=4). One-way ANOVA followed by Tukey's range test was performed to rank the treatment groups. Different letters indicate statistically significant differences between phases ($p < 0.05$). ANOVA: $F = 46.88$, $p < 0.001$.

Supplementary Material

FASTA sequences of *vasa* gene fragments obtained from ONT sequencing

The following sequences represent the consensus sequences generated from Oxford Nanopore Technology (ONT) sequencing of *vasa* gene fragments from *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*. Sequences were derived from filtered reads (Q≥10) and assembled using Medaka v2.0.1.

>Barcode01_Piaractus_brachypomus_*vasa*_fragment

CTAAAGAAGAAAGGCAAACGCTTATGTTCAGTGCGACATATCCAGAAGATA

TTCAAAGGCTGGCAGCTGATTTCTTAAAGACAGACTATCTGTTTCTTGGAT

CAGATGAGGAAGAGGCAGCTGAGGAATTTCTTGACAAGTATGAGAAGGCCT

TCACCGAAGAAAGAACTGTTTCCAAGATTGCTGTTCTGCATGGTGGAGATG

GCTCCATTGAGGATGTTGTCGATGATGTTGTGGAGGGCTTAAGTCAGGA

>Barcode02_Piaractus_brachypomus_*vasa*_fragment

GAAGAAAGGCAAACGCTTATGTTCAGTGCGACATATCCAGAAGATATTCAA

AGGCTGGCAGCTGATTTCTTAAAGACAGACTATCTGTTTCTTGGATCAGAT

GAGGAAGAGGCAGCTGAGGAATTTCTTGACAAGTATGAGAAGGCCTTCACC

GAAGAAAGAACTGTTTCCAAGATTGCTGTTCTGCATGGTGGAGATGGCTCC

ATTGAGGATGTTGTCGATGATGTTGTGGAGGGCTTAAGTCAGG

>Barcode03_Colossoma_macropomum_*vasa*_fragment

CTAAAGAAGAAAGGCAAACCCTTATGTTCAGCGCGACATATCCAGAAGATA

TTCAAAGGCTGGCAGCTGATTTCTTAAAGACAGACTATCTGTTTCTTGGAT

CAGATGAGGAAGAGGCAGCAGAGGAATTTCTTGACAAGTATGAGAAGGCAT

TCACCGAAGAAAGAACTGTTTCCAAGATTGCTGTTCTGCATGGTGGAGATG

GCTCCATTGAGGATGTTGTTGATGATGTTGTGGAGGGCTTGAGTCAAGA

>Barcode04_Colossoma_macropomum_*vasa*_fragment

CTAAAGAAGAAAGGCAAACCCTTATGTTCAGCGCGACATATCCAGAAGATA

TTCAAAGGCTGGCAGCTGATTTCTTAAAGACAGACTATCTGTTTCTTGGAT

CAGATGAGGAAGAGGCAGCAGAGGAATTTCTTGACAAGTATGAGAAGGCAT

TCACCGAAGAAAGAACTGTTTCCAAGATTGCTGTTCTGCATGGTGGAGATG

GCTCCATTGAGGATGTTGTTGATGATGTTGTGGAGGGCTTGAGTCAAGA

Note: Sequences represent partial fragments of the *vasa* gene used for species identification and comparative analysis. Nucleotide differences between *C. macropomum* and *P. brachypomus* sequences are highlighted by the key substitution at position 28 where *C. macropomum* contains "CC" (Barcode03-04) while *P. brachypomus* contains "CG" (Barcode01-02), consistent with the phylogenetic relationship described in the main text.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese investigou a expressão do gene *vasa* durante a espermatogênese em *Colossoma macropomum* (tambaqui) e *Piaractus brachypomus* (pirapitinga), espécies de grande relevância econômica para a aquicultura amazônica, visando estabelecer bases científicas para biotecnologias reprodutivas que contribuam para a conservação da diversidade genética.

Principais Achados

AA revisão sistemática de 44 estudos abrangendo 27 espécies de teleósteos revelou concentração excessiva em espécies modelo (zebrafish, medaka, truta arco-íris, linguado japonês) representando mais de 40% dos estudos, e significativa sub-representação de espécies tropicais amazônicas. As principais aplicações incluem transplante de células germinativas (31,8%), criopreservação (27,3%), esterilização reprodutiva (18,2%) e transgênese (15,9%). Contudo, identificaram-se inconsistências metodológicas críticas, ausência de validação inter-laboratorial em 77% dos estudos, falta de avaliação de viabilidade econômica em todos os estudos revisados, e comparação insuficiente com marcadores alternativos como *dnd* em 85% das aplicações.

Os resultados experimentais confirmaram especificidade gonadal estrita da expressão de *vasa* em ambas espécies através de análise de fold change, com expressão exclusivamente detectada no tecido gonadal e ausência completa em todos os tecidos somáticos analisados (cérebro, fígado, músculo, rim, baço e intestino). O sequenciamento por Oxford Nanopore Technologies confirmou 100% de identidade em *C. macropomum* com sequências de referência (GenBank MF966151.2), enquanto *P. brachypomus* mostrou alta similaridade (98,85-98,92%) com genes *DDX4* de espécies characídeas relacionadas, particularmente *Pygocentrus nattereri*.

Padrões Fase-Dependentes da Expressão

A análise histológica revelou características distintivas entre fases reprodutivas. Em *C. macropomum*, testículos imaturos iniciais apresentaram conteúdo germinal mínimo com espermatogônias primárias esparsas; imaturos tardios exibiram espermatogônias organizadas em espermatocistos primitivos com arquitetura lobular estabelecida; e regenerantes mostraram estrutura lobular organizada com extensa proliferação espermatogonial.

Em *P. brachypomus*, testículos imaturos apresentaram conteúdo germinal mínimo com espermatogônias primárias dispersas; regenerantes exibiram arquitetura lobular bem organizada com proliferação espermatogonial ativa; e capazes de desovar mostraram estrutura lobular madura com abundantes espermatozoides livres nos lúmens.

A expressão de *vasa* mostrou padrões significativamente diferentes entre fases reprodutivas ($p < 0,001$) que correlacionaram diretamente com abundância espermatogonial. Em *C. macropomum*, a expressão seguiu o padrão regenerante > imaturo tardio > imaturo inicial ($F = 19,54$, $p < 0,001$), enquanto *P. brachypomus* apresentou regenerante > imaturo > capaz de desovar inicial > capaz de desovar tardio ($F = 46,88$, $p < 0,001$).

Implicações Práticas

As fases regenerantes apresentaram maior expressão de *vasa* em ambas espécies, seguidas pelas fases imaturas, enquanto fases capazes de desovar exibiram menor expressão. Embora fases regenerantes representem teoricamente doadores ótimos por sua alta abundância espermatogonial, considerações práticas favorecem espécimes imaturos: maior disponibilidade de produtores comerciais, menor custo de aquisição, facilidade de manejo de peixes menores, e redução de requisitos de infraestrutura. Considerando que técnicas modernas de isolamento e enriquecimento celular podem compensar parcialmente diferenças quantitativas na densidade celular, o uso de espécimes de fases com expressão detectável de *vasa* e espermatogônias viáveis representa compromisso razoável entre eficiência biológica e viabilidade prática.

Limitações e Direções Futuras

A revisão sistemática identificou limitações sistêmicas que limitam a aplicação prática das tecnologias baseadas em *vasa*: (1) falta de validação cruzada entre laboratórios em 77% dos estudos, (2) ausência de avaliações de viabilidade econômica em todos os estudos revisados, (3) adaptações espécie-específicas que impedem padronização, e (4) comparação insuficiente com marcadores moleculares alternativos em 85% das aplicações. Evidências sugerem que *dnd* frequentemente supera *vasa* para aplicações específicas como esterilização, e abordagens multi-marcador mostram resultados promissores.

A variabilidade intra-fase observada (CV: 12-43%) reflete a realidade biológica de que fases reprodutivas representam categorias desenvolvimentais amplas, não estados celulares discretos. Esta variabilidade é comparável à relatada em outros estudos de expressão gênica em peixes, mas manteve diferenças estatisticamente significativas entre fases.

O campo requer evolução de abordagens centradas em *vasa* para estratégias integradas e espécie-específicas, priorizando: protocolos padronizados para espécies comercialmente importantes; avaliação comparativa de marcadores alternativos; expansão para espécies tropicais e marinhas; e avaliação de viabilidade econômica.

Conclusões

Esta pesquisa estabelece *vasa* como marcador germinal confiável em *C. macropomum* e *P. brachypomus*, com padrões de expressão ($p < 0,001$) correlacionados com abundância espermatogonial através das fases reprodutivas. Fases regenerantes mostraram maior expressão de *vasa* em ambas espécies, fornecendo critérios moleculares claros para seleção ótima de doadores em aplicações de conservação de germoplasma. O sequenciamento molecular confirmou alta conservação entre espécies caracídeas relacionadas, estabelecendo dados de linha de base para implementar biotecnologias reprodutivas nestas espécies aquícolas amazônicas economicamente importantes. A alta similaridade nos padrões de expressão de *vasa* entre as duas espécies sugere que protocolos similares poderiam ser desenvolvidos para ambas, simplificando a implementação prática de estratégias de conservação.

APÊNDICE

NORMAS DA REVISTA ANIMAL REPRODUCTION

INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Animal Reproduction (AR)

DIRETRIZES E POLÍTICAS

Políticas Editoriais Gerais

Manuscritos submetidos devem ser originais e não devem estar em consideração simultânea por qualquer outra publicação ou ter sido previamente publicados em qualquer forma ou meio. Além disso, se o artigo já passou por alguma avaliação prévia, a carta de decisão correspondente deve ser anexada durante a submissão, e este fato deve ser mencionado na Carta de Apresentação submetida. Todos os autores são inteiramente responsáveis por todos os dados, conceitos e informações contidas no artigo.

Taxas de Processamento de Artigo

Este periódico não possui taxas de submissão. Animal Reproduction cobra apenas uma taxa fixa após a aceitação do artigo. Existem três valores diferentes para a Taxa de Processamento de Artigo (APC):

- R$ 1.600,00 para não membros da CBRA
- R$ 800,00 para membros da CBRA
- US$ 650,00 para autores estrangeiros

Isenção e Descontos

Autores de países de baixa renda e sem acesso a financiamento para cobrir as Taxas de Processamento de Artigo podem solicitar isenção ou desconto após o manuscrito ser aceito para publicação.

Políticas de Acesso Aberto, Direitos Autorais e Autoarquivamento

Este é um periódico de acesso aberto, o que significa que todo o conteúdo está livremente disponível sem cobrança ao usuário ou sua instituição. Artigos aceitos

serão publicados como Acesso Aberto e distribuídos sob os termos da Licença de Atribuição Creative Commons.

Os autores de artigos publicados pela Animal Reproduction mantêm os direitos autorais de seu trabalho sem restrições, licenciando-o sob a Licença de Atribuição Creative Commons.

Idioma

Todos os manuscritos devem ser escritos em Inglês Americano Padrão. Recomenda-se o Dicionário Merriam-Webster para verificação ortográfica e as Diretrizes EASE para Autores e Tradutores de Artigos Científicos. Autores cuja língua nativa não é o inglês são fortemente aconselhados a ter seus manuscritos verificados por um revisor familiarizado com linguagem e vocabulário científicos.

PROCESSO DE REVISÃO POR PARES

Animal Reproduction possui um processo de revisão em 3 etapas:

1. **Verificação Técnica**: Todos os manuscritos submetidos passam por verificação técnica para conformidade com as políticas da Animal Reproduction
2. **Pré-avaliação Editorial**: Os manuscritos são enviados ao Editor-chefe para pré-avaliação incluindo originalidade, escopo e adequação ao periódico
3. **Avaliação por Pares**: Manuscritos aceitos na triagem inicial são enviados para avaliação cega simples por pelo menos dois revisores

POLÍTICAS DE SEÇÃO

Artigos Originais

Artigos relatando estudos de pesquisa original e/ou dados relacionados aos campos temáticos cobertos pela Animal Reproduction. Máximo de 30 páginas.

Artigos de Revisão

Artigos de revisão de interesse para o campo da reprodução animal serão submetidos por convite direto da comissão editorial, mas autores também podem submeter manuscritos de revisão. Máximo de 30 páginas.

Comunicações Breves

Comunicações breves devem relatar ou estar relacionadas a novas técnicas envolvidas na biologia da reprodução. Máximo de 2000 palavras, incluindo a lista de referências, e apenas duas figuras em painel e duas tabelas.

Anais de Conferências

O periódico publica artigos originais completos, resumos e workshops quando apresentados em conferências de Sociedades Acadêmicas de Reprodução Animal apoiadas pelo periódico.

AUTORIA E DIVULGAÇÕES

Linha de Autoria

Autores devem concordar com a autoria do manuscrito, garantindo que ela ilustre com precisão e inclua contribuidores que realmente e significativamente contribuíram para o trabalho. Todos aqueles listados como autores devem se qualificar para autoria de acordo com as contribuições substanciais no conceito e design do trabalho, aquisição de dados, interpretação e avaliação.

Contribuições e Responsabilidade dos Autores

Todos os autores devem aprovar a versão final do manuscrito e ser responsáveis por cada parte do trabalho colaborativo feito em sua versão final. Além disso, a contribuição específica de cada autor de acordo com as designações padrão do CRediT deve ser incluída na Carta de Apresentação.

Mudanças na Autoria após Submissão

Quaisquer mudanças na autoria durante o processo de revisão do manuscrito só serão consideradas pelos editores se experimentos adicionais importantes ou contribuições relevantes tiverem sido feitas e justificadas.

Conflito de Interesses

Autores são obrigatórios a incluir uma declaração divulgando quaisquer potenciais conflitos de interesse. Animal Reproduction considera potenciais conflitos de interesse qualquer evento de natureza pessoal, comercial, política ou acadêmica, envolvendo ou não compensação financeira.

Declaração de Divulgação de Financiamento

Todo apoio financeiro recebido deve ser divulgado por todos os autores.

ÉTICA DE PESQUISA E MÁ CONDUTA DE PUBLICAÇÃO

Autores, Editores e Revisores são esperados a seguir o mais alto nível de ética durante pesquisa, aquisição e processamento de dados, e escrita, avaliação e publicação de manuscritos.

Direitos Humanos e Animais

Autores devem incluir uma declaração detalhando conformidade com diretrizes e/ou aprovação ética na seção de materiais e métodos do manuscrito. Autores são encorajados a seguir as diretrizes Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) para relatar estudos animais.

DIRETRIZES DE PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS

Unidades de Medida

Unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades.

Abreviações e Símbolos

Abreviações, acrônimos e símbolos devem ser evitados, a menos que amplamente adotados. Ao usar acrônimos ou abreviações, seu significado deve ser totalmente escrito em sua primeira ocorrência no texto.

Carta de Apresentação

A carta de apresentação deve incluir:

- **Apresentação do Manuscrito**: Breve apresentação descrevendo a pesquisa
- **Declaração de Compartilhamento de Dados**: Declaração dos autores sobre depósito e disponibilidade de dados brutos

Documento Principal

O arquivo do documento principal deve ser formatado usando Microsoft Word© 2010 ou mais recente. Páginas devem ser configuradas para tamanho A4 (21,0 x 29,7), com margens de 3 cm, usando fonte Times New Roman tamanho 12, espaçamento duplo, com linhas e páginas numeradas.

Estrutura do Documento Principal:

1. **Página de Título**
    - Tipo de artigo
    - Título corrente (máximo 50 letras)
    - Título do manuscrito
    - Linha de autoria (incluindo ORCID URLs)
    - Afiliações
    - Informações de correspondência
2. **Resumo**
    - Máximo de 300 palavras
    - Deve declarar claramente o propósito do trabalho
3. **Palavras-chave**
    - Máximo de cinco palavras-chave
4. **Introdução**
    - Deve fornecer informações de background levando à hipótese testada
5. **Métodos**
    - Deve incluir design do estudo, tipo de materiais envolvidos, número de animais por grupo
    - Informações sobre registro e aprovação do comitê de ética
6. **Resultados**

- Principais resultados encontrados devem ser claramente declarados

7. **Discussão**
    - Deve ser focada nos resultados encontrados
8. **Conclusão**
    - Principais conclusões apoiadas pelos dados de pesquisa
9. **Agradecimentos**
    - Colaboradores que não atendem aos critérios de autoria
10. **Referências**
    - Deve seguir o estilo Vancouver
11. **Tabelas**
    - Cada uma em página separada
12. **Figuras e Legendas de Figuras**
    - Cada figura em arquivo separado de alta resolução

ESTILO DE REFERÊNCIAS E CITAÇÃO

As referências devem seguir o estilo Vancouver. As referências devem ser listadas primeiro em ordem alfabética, depois por ano.

Citações no Texto

- Autor único: (Ginther, 1992) ou Ginther (1992)
- Dois autores: (Varley and Foxcroft, 1990) ou Varley and Foxcroft (1990)
- Mais de dois autores: (Quintero et al., 2000) ou Quintero et al. (2000)

Exemplos de Lista de Referências

Para ARTIGOS EM PERIÓDICOS:

Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. Biol Reprod.

1999a;61(3):724-30. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod61.3.724. PMid:10456850.

Para LIVROS:

Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2nd ed. Cross Plains: Equiservices Publishing; 1992. p. 105-72.

SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

Todos os manuscritos devem ser submetidos usando o sistema de submissão online disponível em: https://mc04.manuscriptcentral.com/ar-scielo

POLÍTICAS DE COMPARTILHAMENTO DE DADOS

Animal Reproduction está desenvolvendo suas políticas de compartilhamento de dados com as Diretrizes TOP (Transparência e Promoção de Abertura) em mente. A partir de julho de 2019, Animal Reproduction está encorajando autores a depositar seus dados de pesquisa no repositório de dados relevante.

POLÍTICA DE CORREÇÕES E RETRAÇÕES

Animal Reproduction endossa totalmente as recomendações do ICMJE e está comprometida em publicar correções quando problemas são detectados em informações publicadas que afetam o registro de publicação e/ou sua precisão científica.

INFORMAÇÕES DE CONTATO

Sistema de Submissão: https://mc04.manuscriptcentral.com/ar-scielo

Homepage do Periódico: https://www.animal-reproduction.org/

Nota: Este anexo contém as normas da revista Animal Reproduction, periódico para o qual será formatado o manuscrito desta tese. As normas aqui apresentadas foram seguidas na elaboração do manuscrito conforme exigido pelas diretrizes do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS para teses na forma de artigos científicos.

of Fishes is an international journal that publishes original studies on the ecology, life history, epigenetics, behavior, physiology, morphology, systematics and evolution of marine and freshwater fishes. Manuscripts that provide insight into the biology of fishes in relation to their environment are particularly welcomed.

MANUSCRIPT SUBMISSION

General Guidelines

- Manuscripts should be submitted online via the journal's submission system
- All submissions must be in English
- Manuscripts should be double-spaced throughout
- Use 12-point Times New Roman font
- Number all pages consecutively
- Include line numbers for easy reference during review

Manuscript Structure

1. **Title Page**
    - Concise and informative title
    - Author names and affiliations
    - Corresponding author contact information
    - Running head (maximum 50 characters)
2. **Abstract**
    - Maximum 250 words
    - Should summarize the main findings
    - No references in abstract
3. **Keywords**
    - Provide 4-6 keywords
    - Separate with semicolons

- Avoid words already in the title

4. **Introduction**
    - Provide sufficient background
    - State objectives clearly
    - Cite relevant literature
5. **Materials and Methods**
    - Provide sufficient detail for replication
    - Include statistical methods
    - Describe ethical considerations
6. **Results**
    - Present findings clearly
    - Use appropriate figures and tables
    - Avoid repetition between text and figures/tables
7. **Discussion**
    - Interpret results in context of existing knowledge
    - Address study limitations
    - Suggest future research directions
8. **Conclusions**
    - Summarize main findings
    - Highlight significance
9. **Acknowledgments**
    - Brief and specific
10. **References**
    - Follow journal style

- Arrange alphabetically by first author

FORMATTING REQUIREMENTS

Text Formatting

- Use standard fonts (Times New Roman, 12 pt)
- Double-space all text
- Justify text
- Use standard margins (2.5 cm all around)
- Number pages consecutively

Figures

- High resolution (minimum 300 dpi)
- Submit as separate files
- TIFF or EPS format preferred
- Color figures accepted online
- Include detailed captions

Tables

- Submit as editable text
- Number consecutively
- Include descriptive titles
- Place footnotes below table

References

Format: Author(s) (Year) Title. Journal Volume:pages

Journal article: Smith AB, Jones CD (2023) Fish behavior in changing environments. Environ Biol Fish 45:123-145

Book: Brown EF (2022) Marine fish ecology. Academic Press, New York

Book chapter: Wilson GH (2021) Reproductive strategies. In: Taylor IJ (ed) Fish biology. Springer, Berlin, pp 45-67

REVIEW PROCESS

Peer Review

- All manuscripts undergo double-blind peer review
- Typical review time: 8-12 weeks
- Authors receive detailed reviewer comments
- Revision may be required before acceptance

Editorial Decisions

- Accept
- Minor revision
- Major revision
- Reject

PUBLICATION ETHICS

Authorship

- All authors must have contributed significantly
- Corresponding author responsible for communication
- Changes to authorship require all authors' consent

Conflicts of Interest

- Declare all potential conflicts
- Include funding sources
- Mention commercial relationships

Data Availability

- Data supporting conclusions should be made available
- Deposit in appropriate repositories when possible

- Include data availability statement

SPECIAL CONSIDERATIONS

Animal Welfare

- Research must comply with ethical guidelines
- Include ethics approval statement
- Describe animal care procedures

Environmental Impact

- Consider environmental implications
- Discuss conservation relevance
- Address sustainability issues

OPEN ACCESS OPTIONS

- Hybrid journal with open access options
- Author-paid open access available
- Check institutional agreements
- Copyright retained by authors for OA articles

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

- Authors receive electronic proofs
- Corrections should be minimal
- Return within 48 hours

Publication

- Online first publication
- Inclusion in next available issue
- DOI assigned immediately

CONTACT INFORMATION

Editorial Office: Environmental Biology of Fishes Springer Nature Editorial Department Email: editorial@environmentalbiologyoffishes.com

Technical Support: Manuscript Central Support Email: support@manuscriptcentral.com

---

ADDITIONAL RESOURCES

- Author guidelines: www.springer.com/environmentalbiologyoffishes
- Submission system: www.editorialmanager.com/ebfi
- Journal homepage: www.springer.com/journal/10641

Nota: Este anexo contém as normas da revista Environmental Biology of Fishes, periódico para o qual foi formatado o Capítulo II desta tese (Artigo de Revisão Sistemática). As normas aqui apresentadas foram seguidas na elaboração do manuscrito conforme exigido pelas diretrizes do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS para teses na forma de artigos científicos.

VITA

José Luis Enrique Garcia Candela, peruano, nascido em 2 de outubro de 1987 na cidade de Bellavista, província constitucional de Callao, Peru, filho de Zoila Victoria Candela Bocanegra, concluiu sua formação secundária em 2004 no colégio particular José Antonio Encinas e obteve o título de Médico Veterinário em 2013 pela Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Iniciou sua carreira profissional em 2014 como assistente de pesquisa no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Tecnológico da Produção, desenvolvendo atividades de diagnóstico molecular de patógenos virais de importância em saúde pública em moluscos bivalvos mediante técnicas de PCR, qPCR e RT-qPCR, além de cultivo celular para isolamento de organismos virais como rotavírus e adenovírus. Em 2018 assumiu a responsabilidade técnica do Laboratório de Investigação e Análise (LIA) no CITE Produtivo San Martín da RED CITE de ITP, exercendo funções de gestão laboratorial, coordenação dos serviços analíticos oferecidos e atividades de pesquisa na área de genômica bacteriana e análise de expressão diferencial de genes por RT-qPCR, obtendo no mesmo ano o grau de Mestre em Farmacologia pela UNMSM. Em 2020 ingressou no programa de doutorado em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil, área de concentração em Produção Animal, sob orientação do Dr. Danilo Pedro Streit Jr., desenvolvendo pesquisas sobre expressão diferencial do gene vasa em tecidos testiculares de espécies de peixes nativos, com foco na caracterização molecular de células germinativas e sua aplicação em biotecnologias reprodutivas.