

**José Max Barbosa de Oliveira Junior**  
**Lenize Batista Calvão**  
**(Organizadores)**



**As Ciências  
Biológicas e a  
Construção de  
Novos Paradigmas  
de Conhecimento**

José Max Barbosa de Oliveira Junior  
Lenize Batista Calvão  
(Organizadores)

# As Ciências Biológicas e a Construção de Novos Paradigmas de Conhecimento

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Rafael Sandrini Filho  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
C569	As ciências biológicas e a construção de novos paradigmas de conhecimento [recurso eletrônico] / Organizadores José Max Barbosa de Oliveira Junior, Lenize Batista Calvão. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-540-2 DOI 10.22533/at.ed.402191508  1. Biotecnologia. 2. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. 3. Ecologia. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Calvão, Lenize Batista.  CDD 660.6
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

A obra “**As Ciências Biológicas e a Construção de Novos Paradigmas de Conhecimento**” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com nove capítulos o volume I apresenta uma vasta heterogeneidade de conceitos e aplicações nas áreas de Biotecnologia, Genética, Saúde humana, Educação bem como a importância das condições ambientais que as espécies estão inseridas. No cenário atual de mudanças ambientais correntes e avanços tecnológicos é extremamente importante o uso adequado de técnicas em cada área.

O E-Book foi dividido em nove capítulos que abordam estratégias didáticas usando práticas em campo para alunos da educação básica. As aplicações dessas práticas permitem os discentes observar por si próprios novos domínios do conhecimento incluindo áreas com conceitos complexo como em Ecologia. Esse avanço possibilita a longo prazo que os alunos sejam participativos nas decisões do meio em que vivem. O tema sobre Saúde humana se encontra em pauta trazendo os aspectos nutricionais de adolescentes com e sem Síndrome de Down. Discussões importantes como obesidade e baixa ingestão de fibras realizada pelos jovens devem ser elencados para uma educação alimentar desde os primeiros anos escolares.

As aplicações de técnicas adequadas de Biotecnologia são extremamente importantes para uso de produtos eficazes em diversas áreas. Adicionalmente, análises citogenéticas fornecem informações que são relevantes e direcionar um correto aconselhamento genético familiar. O livro também traz publicações que contribui com avanços na área da medicina veterinária, através da avaliação macroscópica e microscópicamente de lesões cranioencefálicas de cães e gatos.

Por fim, atividades humanas como construção de reservatórios são cada vez mais frequentes em sistemas naturais, desta forma a avaliação das condições ambientais da variação espacial é muito importante para conservação das espécies. Os estudos apresentados aqui, em português e linguagem acessível, são de extrema relevância nas áreas destinadas a saúde humana, sociais, medicina veterinária e relação das espécies com ambiente englobando uma série de perguntas intrigantes e também compreensível a jovens cientistas.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

Lenize Batista Calvão

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
A BOTÂNICA COM FOCO NO OLHAR DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE UMA ESCOLA ESTADUAL DE COMODORO - MT	
Josefa Silva dos Santos Jucimar Silva dos Reis	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915081</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>11</b>
ANÁLISE DA DIETA E ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN: ESTUDO DE CASO-CONTROLE	
Bruna Rongetta Torres Amanda Daniel Natalia Tonon Domingues Luiza Tavares Carneiro Santiago Cristina Helena Lima Delambert Bizzotto Carlos Alexandre Hattori Tiba Lidia Raquel De Carvalho Catia Regina Branco Da Fonseca	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915082</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>22</b>
AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FOLHAS DE <i>Piptadenia stipulacea</i>	
Geovanna Hachyra Facundo Guedes Bruno Mendes Tenorio José Anderson da Silva Gomes Letícia Simone Melo dos Santos Marcos Aurélio Santos da Costa Maria Luísa Figueira de Oliveira Matheus Carvalho Brito Leite Renatha Claudia Barros de Sobreira Tainá Maria Santos da Silva Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório Carolline Guimarães D'Assunção Cintia Giselle Martins Ferreira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915083</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>31</b>
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DE LESÕES CRANIOENCEFÁLICAS EM PEQUENOS ANIMAIS	
Barbara Wagner Duarte Ferraz de Camargo Tália Missen Tremori Selene Daniela Babboni Maria Jaqueline Mamprim Noeme Sousa Rocha	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915084</b>	

<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>45</b>
CRISPR/CAS9 COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO NICHOS ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH ( <i>DANIO RERIO</i> )	
Matheus Morais Miranda	
Lucas Benites Doretto	
Rafael Henrique Nóbrega	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915085</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>59</b>
PHYTOCHEMICAL STUDY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF <i>Anacardium occidentale</i> L. AND <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	
Sérvio Quesado Junior	
Márcia Maria Mendes Marques	
Ana Raquel Araújo da Silva	
Maria Izabel Florindo Guedes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915086</b>	
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>69</b>
LIMNOLOGIA COMPARADA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE HABITATS DO RESERVATÓRIO DE ROSANA, RIO PARANAPANEMA (SP/PR)	
Rafaela Shizuko Yamashita Kimura	
João Felipe Denys Pereira	
Maria Luisa Passos Frigero	
Marco Aurélio Pessotto	
Pedro Vinícius Melo dos Santos	
Marcos Gomes Nogueira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915087</b>	
<b>CAPÍTULO 8</b> .....	<b>81</b>
OLIGOMERIZAÇÃO DO COMPLEXO FERRITINA-LIGANTE POR MEIO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA FERRITINA DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
Giovanna Tavares Jeronymo	
Ricardo Barros Mariutti	
Thaís Caroline Serafim	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915088</b>	
<b>CAPÍTULO 9</b> .....	<b>93</b>
TRANSLOCAÇÃO BALANCEADA HERDADA T(8;19)(Q12;Q13)MAT CONCOMITANTE À DELEÇÃO DE 15Q11.2 EM UM PACIENTE COM SÍNDROME DE ANGELMAN (SA) - A CITOGENÉTICA CLÁSSICA NÃO EVANESCE	
Elenice Ferreira Bastos	
Carlos Roberto da Fonseca	
Patrícia Santana Correia	
Cristiane Queila Ebraim Barros	
Ingrid Bendas Feres Lima	
Anna Luiza Vaz Serrão	
Lúcia de Fátima Marques de Moraes	
Juan Clinton Llerena Jr	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915089</b>	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES</b> .....	<b>99</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO</b> .....	<b>99</b>

## CRISPR/CAS9 COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO NICHOS ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

### Matheus Morais Miranda

UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências  
Botucatu - SP

### Lucas Benites Doretto

UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências  
Botucatu - SP

### Rafael Henrique Nóbrega

UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências  
Botucatu - SP

**RESUMO:** A espermatogênese é um processo altamente complexo, no qual envolve a geração de milhões de gametas haplóides (espermatozoides) a partir de uma única espermatogônia tronco. Esse tipo específico de célula apresenta uma função imprescindível para a evolução, já que é a partir dos gametas que mutações são acumuladas ao longo do tempo e transmitidas para as próximas gerações, permitindo o surgimento de novos caracteres e consequentemente podendo representar uma maior diversidade. Este processo é orquestrado por hormônios gonadotrópicos que se ligam a receptores presentes nas células somáticas do testículo, regulando localmente a atividade das espermatogônias tronco pela liberação de

fatores de crescimento. As gonadotropinas hipofisárias - hormônio folículo-estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh) - controlam o desenvolvimento e funcionamento gonadal através da regulação da atividade de sinais locais, como esteróides sexuais, fatores de crescimento, pequenos RNAs e mudanças epigenéticas. No entanto, os mecanismos que regem a regulação parácrina e endócrina no nicho espermatogonial são incertos. Para responder essas diversas questões sobre a regulação das espermatogônias tronco, o sistema CRISPR/Cas9 surge como ferramenta para nocautear os genes que codificam os receptores envolvidos nesse processo, a fim de investigar o papel desempenhado pelo Fsh e andrógenos no desenvolvimento gonadal dos peixes teleósteos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Espermatogênese, Crispr/Cas9, Zebrafish.

### CRISPR/CAS9 AS A TOOL TO STUDY THE SPERMATOGONIAL NICH OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

**ABSTRACT:** Spermatogenesis is a complex process, in which millions of haploids gametes are formed from a single spermatogonial stem cell. This specific cell type presents an essential function on evolution, since it is from the gametes



that mutations are accumulated through time and transmitted to the next generation, allowing the appearance of new characters and consequently can represent a greater diversity. This process is orchestrated by gonadotropic hormones that bind to testicular somatic cells, regulating locally, the spermatogonial stem cell activity by growth factors production. The pituitary gonadotropins - follicle stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh) - control development and gonadal function, regulating the local signals as sexual steroids, growth factors, small RNAs and epigenetic changes. Currently, mechanisms regulating the paracrine and endocrine of spermatogonial niche are still uncertain. To answer the questions about spermatogonial stem cell regulation, CRISPR/Cas9 system emerges as a tool to knockout receptor encoding genes, in order to investigate Fsh and androgens role on teleost gonadal development.

**KEYWORDS:** Spermatogenesis, Crispr/Cas9, Zebrafish.

## 1 | INTRODUÇÃO

A espermatogênese é um processo altamente organizado, no qual células indiferenciadas, as espermatogônias tronco, transmitem o material genético de um indivíduo para a próxima geração através de ciclos de mitose e meiose, através da formação de espermatozoides capacitados a fertilizar os oócitos (Hess & França, 2008; Schulz et al., 2010). Neste sentido, as espermatogônias tronco são as únicas células tronco do corpo capazes de contribuir na formação do material genético da prole, e, portanto, mostram ser peças chave na evolução (Hofmann, 2008). As espermatogônias tronco possuem potencial de auto-renovação, para manter sua população de células no testículo, assim como também de produzir células altamente diferenciadas comprometidas com o processo de formação de gametas. As espermatogônias tronco residem em um microambiente específico no testículo conhecido como nicho espermatogonial (Figura 1 e 2) (de Rooij, 2006; de Rooij 2009; Oatley & Brinster, 2008). Tanto em peixes como em mamíferos, o nicho é composto tanto por células germinativas quanto somáticas (Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010). Em peixes, dois tipos de células tronco são encontradas entre a linhagem germinativa de zebrafish (Leal et al., 2009): espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund\*, que apresentam características típicas de células indiferenciadas, tais como núcleo amplo com pouca heterocromatina, grande volume de citoplasma e “nuages” (acúmulo de RNA) ao redor do envoltório nuclear, e espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund, com maior presença de heterocromatina, menor volume citoplasmático e menor quantidade de “nuages”. As células somáticas são responsáveis pela função de sustentação e fornecimento de fatores de crescimento, sendo representadas pelas células de Sertoli, células peritubulares mióides e células de Leydig (Nóbrega et al., 2010). As células de Sertoli estão localizadas no interior dos túbulos seminíferos e estão em íntimo contato com as células germinativas. Além de suporte estrutural, as células de Sertoli são responsáveis por integrar

sinais endócrinos, produzindo diversos fatores de crescimento (Nóbrega et al., 2014). Dentre estes fatores de crescimento produzidos pelas células de Sertoli, destacam-se aqueles que atuam no nicho espermatogonial como o GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor (auto-renovação) (Meng et al., 2000; Yomogida et al., 2003; Savitt et al., 2012), activina A, BMP4 (bone morphogenetic protein 4) (Loveland and Robertson, 2005) (diferenciação) e Igf3 (Nóbrega et al., 2015), Amh (Skaar et al., 2011) e outros. As células peritubulares mióides envolvem os túbulos seminíferos tendo um papel de suporte estrutural nos testículos (Oatley et al., 2009). Estas células também secretam certas substâncias, incluindo fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, que regulam as espermatogônias tronco (Oatley et al., 2009). Por exemplo, as células peritubulares mióides e as células de Leydig secretam o CSF1 (colony-stimulating factor 1) que estimula a auto-renovação das espermatogônias tronco (Oatley et al., 2009). As células de Leydig por sua vez, encontradas no compartimento intersticial, tem como função produzir andrógenos e fatores de crescimento (Oatley et al., 2009), como Inls3 (Assis et al., 2016). O nicho espermatogonial apresenta diferentes formas de organização nas mais diversas espécies de vertebrados. Em anamniotas (peixes e anfíbios), a espermatogênese é classificada como cística, pois um grupo de células de Sertoli envolve uma única espermatogônia indiferenciada (espermatogônia tronco), formando o cisto. O desenvolvimento das células germinativas ocorre no interior dos cistos até a formação de espermatozóides que são posteriormente liberados dos cistos para o interior dos túbulos seminíferos, logo tais cistos compreendem a unidade morfofuncional das gônadas de anamniotas (Lacerda et al., 2014). Em amniotas (répteis, aves e mamíferos), a organização é não-cística, ou seja, a célula de Sertoli suporta ao mesmo tempo diferentes “clones” de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (Grier, 1993; Pudney 1993; 1995; Schulz et al., 2010).

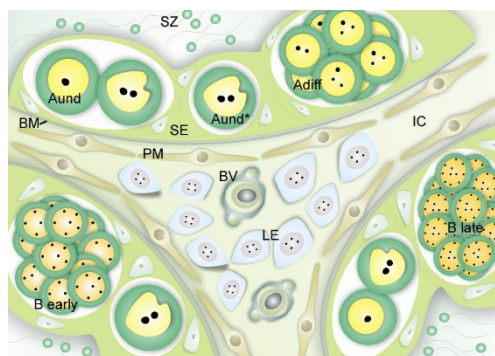


Figura 1. Nicho espermatogonial em zebrafish, *Danio rerio*. As espermatogônias tronco distribuem-se preferencialmente nas regiões dos túbulos seminíferos próximas das áreas de confluência de tecido intersticial, onde estão localizadas as células produtoras de esteróides, as células de Leydig (LE), vasos sanguíneos (BV) e outros elementos do tecido conjuntivo. **BM**, membrana basal; **PM**, células peritubulares mióides; **SE**, células de Sertoli; **A<sub>und</sub>\*/A<sub>und</sub>**, espermatogônias iniciais; **Adiff**, espermatogônias diferenciadas; **B early**, espermatogônias do tipo B inicial; **B Late**, espermatogônias do tipo B final; **SZ**, espermatozóides; e seta indicando o epitélio germinativo. Retirado de Nóbrega (2014).

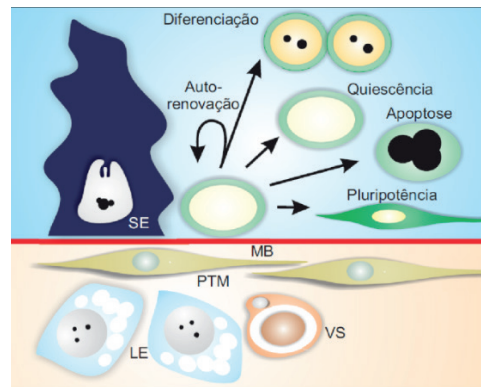


Figura 2. Representação esquemáticas do nicho das espermatogônias tronco em roedores. Apesar da membrana basal ser uniforme ao longo da circunferência dos túbulos seminíferos, as espermatogônias tronco concentram-se preferencialmente nas áreas próximas do interstício, em especial de células de Leydig e vasos sanguíneos. O nicho das espermatogônias tronco, portanto, é definido pelas células de Sertoli (**SE**), membrana basal (**MB**), células peritubulares mióides (**PTM**) subjacentes e pelos elementos intersticiais, como células de Leydig (**LE**) e vasos sanguíneos (**VS**). Através de sua composição celular e molecular, o nicho regula as propriedades das espermatogônias tronco. Retirado de Nóbrega (2014).

### 1.1 Zebrafish (*Danio Rerio*)

O Zebrafish (*Danio rerio*) pertence a família Cyprinidae, representando a maior família de peixes de água doce, e com exceção da Gobiidae, representa a maior família de vertebrados (Nelson, 1994) (Figura 3).



Figura 3. Imagem mostra *Danio rerio* e suas características. Proveniente da Índia, esse peixe é conhecido popularmente como zebrafish por apresentar listras escuras horizontais, possui corpo fusiforme e achatado lateralmente.

O mecanismo de determinação sexual nesses organismos ainda é um assunto desconhecido, mas sabe-se que inicialmente todas as gônadas se desenvolvem como ovários e a diferenciação sexual masculina ocorre na 5-7 semana após eclosão, no qual os testículos se formam a partir da degeneração do ovário (hermafroditismo juvenil).

O Zebrafish vem sendo utilizado amplamente como organismo modelo em diversas áreas de pesquisa, como biologia do desenvolvimento, estudos toxicológicos, neurofisiologia, genética e em pesquisas biomédicas. A escolha desse animal na experimentação se dá devido ao fato de possuir características favoráveis como seu pequeno porte possibilitando manter de um grande número de indivíduos

em um mesmo tanque, o que resulta em um baixo possível de manutenção, são animais que se reproduzem durante todo o ano. O período entre as gerações comparada com outros modelos vertebrados é curta, levando de 3-4 meses para que os novos indivíduos atinjam a fase adulta, sendo então muito útil para pesquisas sobre gerações. São animais com fertilização externa e os ovos são transparentes, sendo os embriões passíveis de serem manipulados facilmente para pesquisas de desenvolvimento embrionário, onde os estágios de desenvolvimento são visíveis ao estereomicroscópio. O zebrafish foi assunto das primeiras análises de scaneamento de genoma em busca de mutações aleatórias em larga escala realizada em vertebrados (Granato & Nüsslein-Volhard, 1996). Os resultados mostraram mais de 4.000 mutações e identificaram mais de 400 genes relacionados ao controle do desenvolvimento de vertebrados. Desde então com o avanço tecnológico, foi criado o “Zebrafish Genome Project”, baseado no Instituto Sanger em Cambridge (Driever et al., 1996).

## 1.2 Crispr-Cas9 como Técnica para Gerar *Knockouts*

O sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas foi descoberto em 1987 por Yoshizumi Ishino e colaboradores da Universidade de Osaka (Japão). Estes pesquisadores identificaram um loco peculiar no genoma de *Escherichia coli*, constituído por uma configuração incomum: sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas (“spacer”) de função desconhecida. Apenas em 2005, foi sugerido que o sistema CRISPR-Cas9 seria um sistema imune adaptativo de procariotos, no qual os espaçadores serviriam como “memória de invasões anteriores” por bacteriófagos (Mojica *et al.*, 2005). Assim, RNAs derivados desses espaçadores serviram como moléculas complementares aos patógenos invasores, permitindo combatê-los de maneira sequência-específica (Introdução à técnica de CRISPR. SBG. Pág. 30 cap 1). Somente em 2012/13 foi descoberto que essa técnica poderia ser utilizada no meio científico. Duas publicações merecem destaque nesse quesito, a primeira, que introduziu o conceito e evidenciou seu potencial (Jinek *et al.*, 2012) e uma segunda, onde foi mostrado o amplo sucesso, fácil acessibilidade e versatilidade da técnica (Cong *et al.*, 2013).

A técnica baseia-se na síntese de uma molécula de RNA complementar à uma sequência genômica alvo. Para tal, o RNA se associa à uma endonuclease que o guia até seu alvo complementar. Quando há complementariedade do RNA para com o alvo e a endonuclease reconhece a sequência PAM (Figura 4), ocorre a clivagem dos nucleotídeos. Essa enzima com atividade nuclease é a Cas-9, pertencentes à família das enzimas Cas (Figura 4). Com a mutação, a sistema de reparo de DNA da célula é ativado e inserções ou deleções de pares de bases acabam por abolir a expressão do gene alvo.

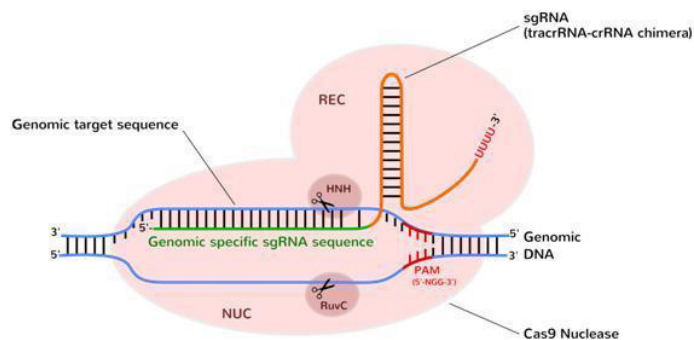


Figura 4. CRISPR-Cas9 e seus componentes básicos que em conjunto inibem a expressão de um gene de interesse. No DNA genômico encontra-se o gene alvo, onde a Cas9 endonuclease irá produzir uma mutação indel (inserção-deleção). O crRNA (*CRISPR-derived RNA*) juntamente com o tracrRNA (trans-activating RNA) são responsáveis por guiar e ativar o sistema, respectivamente. Atualmente, ambos RNAs são sintetizados numa única molécula, chamada de gRNA ou sgRNA (*single guide RNA*). A sequência 5'-NGG-3' é necessária estar presente adjacente ao alvo, para que a atividade endonucleásica da Cas-9 funcione adequadamente. Tal sequência é conhecida como PAM, ou Protospacer adjacent motif. REC – lobo de reconhecimento e NUC – lobo nucleásico da Cas9. RuvC e HNH são dois domínios da Cas9, cada qual responsável por “cortar” uma fita da molécula de DNA. Imagem retirada de <http://www.ozbiosciences.com/content/58-transfection-reagents-for-genome-editing>.

Em relação às demais técnicas de edição genômica, como ZFN (*Zinc Fingers Nucleases*) e TALENs, (*Transcription Activator-like Effector Nucleases*), o CRISPR-Cas9 apresenta algumas vantagens como: rápida e fácil metodologia, baixo custo e principalmente elevada taxa de sucesso devido a sua alta sensibilidade para o reconhecimento de sequências específicas presentes no DNA (Cencic e Hisashi, 2014).

Estudos de perda e ganho de função tem como objetivo identificar e compreender a função de um determinado gene. Neste sentido, a obtenção de animais *knockouts* podem melhor elucidar o papel de reguladores do nicho espermatogonial em peixes. Considerando as vantagens do sistema CRISPR-Cas9, é possível editar o genoma de diversas espécies com praticidade, eficácia e baixo custo. Somado à isso, trabalhos recentes mostraram que o papel do Fsh e Lh parecem ser dispensáveis para o processo da espermatogênese. Assim, o estudo em conjunto dos receptores para o Fsh e andrógenos, juntamente com análises moleculares e celulares é de grande valia para o entendimento cada vez mais completo da biologia das espermatogônias tronco em peixes.

## 2 | MATERIAL E MÉTODO

Para identificar os alvos para os genes *fshr* e *ar* a serem deletados, foi utilizado o software ZiFit, seguindo critérios para que a eficiência da técnica fosse ideal: Para que houvesse menor possibilidade da ocorrência de “off-targets”, os alvos possuíam entre 18-20 nucleotídeos e eram adjacentes a sequência PAM (NGG) na porção 3' do alvo. Após serem selecionados, os alvos foram “blastados” no database Ensembl



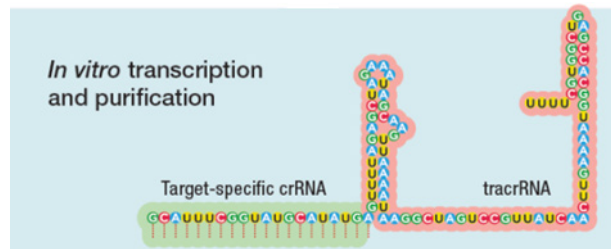


Figura 7. Conformação do gRNA após TIV e purificação. Após estas etapas, basta injetar essa molécula juntamente com a Cas9 em ovos recém-fertilizados. Imagem adaptada de Laurentino, E. CRISPR-Cas9 – Uma introdução à ferramenta e sua aplicação na edição de genomas, 2016.

## 2.1 Reprodução

Os peixes reprodutores foram mantidos em tanques com sistema de circulação e as variáveis foram controladas. Estudos mostram que a dieta e fotoperíodo são fatores cruciais para o sucesso da reprodução, portanto os animais foram alimentados 3 vezes ao dia e suplementados com proteína de origem animal (*Artemia sp*), mantidos a 28 °C e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Para obter os embriões para a microinjeção, os reprodutores foram separados um dia antes da coleta, mantendo machos e fêmeas separados por uma divisória na mesma caixa de reprodução e em uma proporção de 2:1 respectivamente. No dia seguinte, os animais eram colocados em contato e assim acontecia a reprodução. Após meia hora os embriões eram coletados e mantidos em meio para que fossem realizadas as microinjeções.

## 2.2 Microinjeção dos gRNAs e da Cas9 em ovos recém-fecundados de zebrafish

O gRNA para os diferentes alvos/exons do *fshr* foram microinjetados em embriões em estágio de uma célula (ovos recém-fecundados) (Kimmel *et al.*, 1995). Para a microinjeção, uma solução contendo 320ng de cada gRNA mais 200ng de Cas9 e 2% Phenol Red (Sigma Aldrich) foi preparada. Para cada ovo, foi injetado 10% do seu volume total, ou seja, aproximadamente 500 picolitros (pl). Os ovos são injetados através de microinjetor Narishige (IM-11-2 Pneumatic Microinjector). O mesmo protocolo foi seguido para realizar as injeções para os alvos do *ar*.

## 2.3 Análise da eficiência da técnica via T7 endonuclease

Enzima T7endonuclease I (T7E1 - Nem England BioLabs) é capaz de reconhecer e clivar regiões de DNA mal-pareados. A partir dessa técnica é possível identificar, após etapas identificadas na Figura 8, regiões em que a técnica obtivesse sucesso em induzir mutações indel nos alvos dos gRNAs.

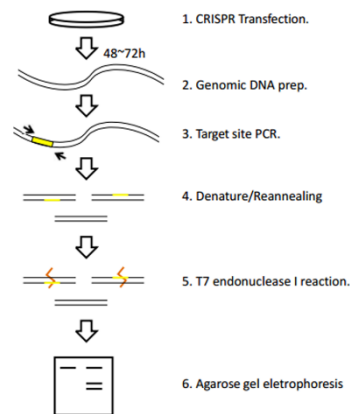


Figura 8. A técnica de T7E1 consiste em se infectar a célula de interesse com seus gRNAs (1) seguida da extração do DNA genômico (2) e ampliação da região de interesse com primers flanqueando a região alvo (3). Após a confirmação da especificidade via sequenciamento ou eletroforese, desnatura-se e renatura-se os amplicons (4) para geração dos mal-pareamentos e consequente identificação pela T7E1 destas regiões (5). Confirmação das mutações através de eletroforese em gel de agarose (6).

### 3 | RESULTADOS

#### 3.1 Seleção de potenciais alvos para gerar gRNA para os alvos *fshr*, *lhcg* e *ar E* **SINTESE DOS ALVOS**

A identificação dos possíveis alvos para suprimir a expressão dos genes *fshr* e *ar* foi realizada pelo software online ZiFit (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>). Este software é uma ferramenta confiável e simples para identificar os possíveis gRNA. Os alvos selecionados para este trabalho contém entre 17 à 20 nucleotídeos e todas as recomendações para evitar alvos não desejáveis, ou seja, “*off-targets*”, foram levadas em consideração. Em seguida, os gRNAs foram sintetizados utilizando protocolo do kit “GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit” (Thermo Fisher Scientific). A sequência nucleotídica dos genes foram obtidas no *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>).

A síntese da molécula de DNA molde foi realizada com primers/oligos específicos para cada alvo (ver abaixo) juntamente com o crRNA/tracrRNA (80 pares de base), conforme especificações do fabricante (Thermo fisher scientific). Conforme protocolo, a molécula de DNA molde obtida deve possuir aproximadamente 100 pares de base (pb), como foi observado em nossas amostras para os alvos do *fshr* (Figura 9). O mesmo protocolo foi seguido para o *ar* e os dados foram confirmados por eletroforese.



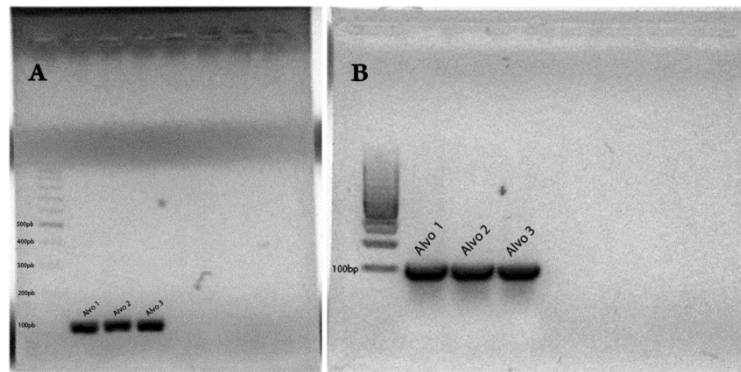


Figura 9. A. Gel de eletroforese 2% para os oligos sintetizados a partir de reações de RT-PCR com primers para os alvos do *fshr* (mostrados acima). Cada alvo representa um exon. A integridade do gRNA obtido (para os 3 alvos/exons do *fshr*) via TIV utilizando como template o produto da RT-PCR obtida em A.

A síntese do gRNA foi realizada a partir do molde de DNA obtido através de uma reação de transcrição *in vitro* (TIV), conforme instruções do fabricante (Thermo fisher scientific). O gRNA obtido teve sua integridade confirmada com eletroforese através de bandas únicas de aproximadamente 100 pares de base.

A eficiência da reação foi considerada ótima, visto que  $5\mu\text{g}$  de gRNA em ( $7\mu\text{g}$  para o alvo 1;  $5,4\mu\text{g}$  para o alvo 2 e  $3,9\mu\text{g}$  para o alvo 3) foram obtidos em média.

### 3.2 Análise da eficiência da técnica e genotipagem

Dois conjuntos de primers foram desenhados para cada alvo flanqueando os sítios de clivagem. Tais primers possuem o objetivo de isolar os três fragmentos de DNA do *fshr* que contenham as possíveis deleções. Logo, para o exon 6, um fragmento de 609 pb foi obtido. Para o exon 8, 386 pb e para o exon 9, 453pb.

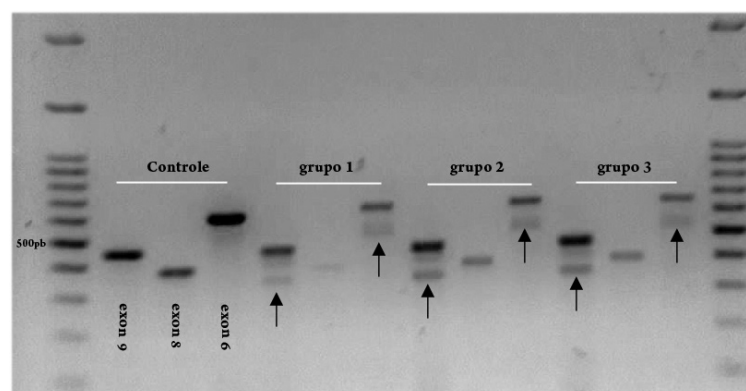


Figura 10. Comparação entre três grupos de embriões de *D. rerio* tratados com T7E1 comparados com o grupo controle (animal não injetado) para análise da eficiência da técnica com gRNAs para *fshr*. Observar que nos grupos contendo apenas embriões injetados, encontra-se bandas extras identificadas por setas. Tais bandas são decorrentes de mal-pareamentos devido a deleções de pares de bases pela técnica CRISPR/Cas-9 identificados e clivados pela T7E1. Tais padrões de bandas mostram que houve eficiência na técnica, porém, para facilitar a genotipagem dos animais knockout.

A microinjeção do gRNA para o receptor de andrógeno foi realizada em um total

de 35 embriões, verificando-se após 5 dias a ocorrência de diferentes níveis de má formação em 20% dos animais injetados (Figura 11).

Para confirmar a possível ocorrência de mutações para o *ar* nesses animais, foram realizadas genotipagens nos animais não injetados (grupo controle), animais injetados apresentando má formação e animais injetados sem má formação.

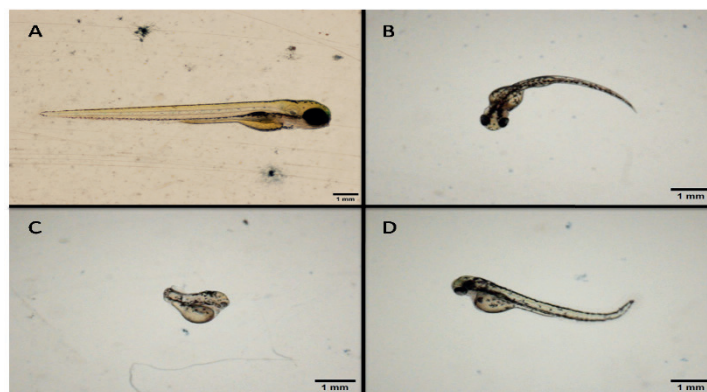


Figura 11. Registro dos animais injetados com gRNA para o receptor de andrógeno. Verificou-se que 20% dos animais injetados apresentavam algum tipo de má formação em diferentes níveis de intensidade. A: animal injetado não portador de má formação. B, C e D: animais injetados e apresentando diferentes níveis de má formação.

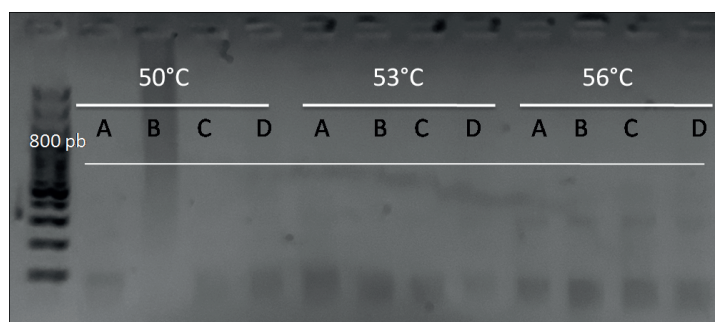


Figura 12. Resultado da comparação de diferentes temperaturas para genotipagem de três grupos de animais injetados para deleção do gene *ar*. A: grupo controle (não injetado), B: larvas de zebrafish com má formação, C, D: larvas de zebrafish injetadas e sem má formação.

#### 4 | DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As regiões alvo dos genes a sofrerem mutações *indel* foram determinadas e algumas tiveram sua síntese finalizada (como é o caso do *fshr* e *ar*). Os genes propostos são os receptores para o hormônio folículo estimulante (Fsh) e o receptor para andrógenos (Ar). O método pelo qual pretendeu-se inibir a expressão de tais receptores foi o sistema CRISPR-Cas9, uma técnica recente, eficiente, barata e acessível. Tal técnica já foi reproduzida com sucesso em diferentes espécies de peixes, como zebrafish (Hwang *et al.*, 2013), truta (Edvardsen *et al.*, 2014) e carpa (Zhong *et al.*, 2016). Nesse trabalho, pretendeu-se identificar as possíveis respostas do nicho espermatogonial quando genes relacionados à sua regulação perdem sua expressão definitivamente. Zhang e colaboradores (2015a) mostraram em zebrafish que a perda de expressão de ambos os ligantes (*fsh* e *lh*) não resultou

em consequências significativas para o desenvolvimento e maturação de gônadas de machos e fêmeas, porém apenas o duplo *knockout* levou à masculinização de fêmeas e ao atraso do desenvolvimento testicular. Estas observações alteram a visão clássica/tradicional da importância dos hormônios gonadotrópicos na reprodução de machos de zebrafish. Além disso, é bem provável que após o início da puberdade induzida pelo Fsh, o testículo torna-se independente deste hormônio. Tal fato é semelhante em mamíferos, onde o FSH é responsável pelo início da espermatogênese, mas não pela sua manutenção (Kumar *et al.*, 1997, Plant *et al.*, 2001, Tapanainen *et al.*, 1997). No entanto, alguns autores afirmam que estas informações ainda são bastante controversas na literatura (Kumar *et al.*, 2009). Talvez, os reguladores mais importantes em zebrafish (e também em mamíferos) estejam atuando à nível parácrino ou autócrino, como mostrado na introdução deste trabalho. Por isso, a análise de testículos *ar* (-/-) e de outros fatores parácrinos, como o Igf3 e Amh e de genes relacionados (cf. *cyp17*, *nanog*, *nanos3* e *pou5f1*) e inclusive o transcriptoma de células germinativas e somáticas isoladamente sob efeito do Fsh será de grande valia visto que andrógenos estão relacionados com a proliferação e diferenciação das espermatogônias tronco em zebrafish adulto e respondem significativamente a aplicação de Fsh recombinante em estudos *in vitro* (artigo em elaboração) naquele sentido. Zhang e colaboradores (2015b) também mostraram que a deficiência na expressão dos genes *fshr* e *lhr* sozinhos não alteram significadamente o desenvolvimento e maturação de ambas gônadas masculinas e femininas. Alguns resultados foram semelhantes ao knockout dos ligantes (Zhang *et al.*, 2015a). Em fêmeas, a deleção do *fshr* levou a sua masculinização, porém em machos, apenas um retardo no desenvolvimento gonadal foi observado. Tal evidência, corrobora com a teoria de que, semelhantemente em mamíferos, em zebrafish o Fsh é responsável apenas pela instalação da puberdade. Mais uma vez, a análise de testículos *ar* (-/-) e de outros fatores e genes relacionados com o controle fisiológico e molecular em gônadas masculinas se faz muito importante para entender o papel destes no controle da reprodução em peixes.

## REFERÊNCIAS

HESS RA, FRANCA LR. (2008) **Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium**. *Adv Exp Med Biol* 636: 1-15.

SCHULZ RW, FRANÇA LR, LAREYE JJ, LE GAC F, CHIARINI-GARCIA H, NÓBREGA RH, MIURA T. 2010. **Spermatogenesis in fish**. *Gen Comp Endocrinol* 165:390-411.

HOFMANN MC. 2008 **Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche**. *Mol Cell Endocrinol*. 288(1-2):95-103. doi: 10.1016/j.mce.2008.04.012.

DE ROOIJ DG. 2006. **Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box**. *Proc Natl Acad Sci* 103(21):7939-7940

DE ROOIJ DG. 2009. **The spermatogonial stem cell niche**. *Microsc Res Tech* 72(8):580-5.

OATLEY JM, BRINSTER RL. (2008) **Regulation of spermatogonial stem cell selfrenewal in mammals**. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 263-286.

LEAL MC, CARDOSO ER, NÓBREGA RH, BATLOUNI SR, BOGERD J, FRANÇA LR, SCHULZ RW. 2009 **Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations** *Biol Reprod* 10.1095/biolreprod.109.076299

NÓBREGA RH, GREEBE CD, VAN DE KANT H, BOGERD J, DE FRANÇA LR, SCHULZ RW. 2010 **Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish**. Milstone DS, ed. *PLoS ONE*.; 5(9):e12808.

NÓBREGA RH. **Spermatogonial stem cells and their endocrine and paracrine regulation in zebrafish**. University of Utrecht 2014.

MENG, XIAOJUAN, et al. (2000) **Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF**. *Science* 287.5457 :1489-1493.

YOMOGIDA, K., YAGURA, Y., TADOKORO, Y. AND NISHIMUNE, Y. (2003). **Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell linederived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells**. *Biol. Reprod.* 69, 1303-1307.

SAVITT, J., SINGH, D., ZHANG, C., CHEN, L. C., FOLMER, J., SHOKAT, K. M., & WRIGHT, W. W. 2012 **The In Vivo Response of Stem and Other Undifferentiated Spermatogonia to the Reversible Inhibition of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the Adult**. *Stem Cells*; 30(4), 732-740.

LOVELAND, K. L., AND D. M. ROBERTSON. (2005) **The TGF $\beta$  superfamily in Sertoli cell biology**. *Sertoli cell biology*: 227-247.

NÓBREGA RH, MORAIS RD, CRESPO D, WAAL PP DE, FRANÇA LR, SCHULZ RW, BOGERD J. 2015 **Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3**. *Endocrinology*. Oct;156(10):3804-17.

SKAAR KS, NÓBREGA RH, MAGARAKI A, OLSEN LC, SCHULZ RW, MALE R. 2011 **Proteolytically activated, recombinant anti-mullerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures**. *Endocrinology*. Sep;152(9):3527-40.

OATLEY, J. M., OATLEY, M J., AVARBOCK, M. R., TOBIAS, J. W. & BRINSTER, R. L. (2009) **Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem ce1111 self-renewal**. *Development*; 136, 1191-1199.

ASSIS LH, CRESPO D, MORAIS RD, FRANÇA LR, BOGERD J, SCHULZ RW. 2016 **INSL3 stimulates spermatogonial differentiation in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*)**. *Cell Tissue Res*. Feb;363(2):579-88.

LACERDA SM, COSTA GM, DE FRANÇA LR. 2014 **Biology and identity of fish spermatogonial stem cell**. *Gen Comp Endocrinol*. Oct 1;207:56-65.

GRIER HJ. 1993. **Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier**. In: RUSSELL LD & GRISWOLD MD (Eds.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, pp 703-739.

PUDNEY J. 1993. **Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell**. In: RUSSELL LD & GRISWOLD MD (Eds.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, pp 611-657.

PUDNEY J. 1995. **Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates**. *Microsc Res Tech* 32:459-497.

NELSON JS. **Fishes of the world**. . Wiley, New York, 1994; v3, p 245

Granato, M., van Eeden, F.J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., and Nüsslein-Volhard, C. (1996) **Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva**. *Development (Cambridge, England)*. 123:399-413.

Driever, W. and Fishman, M.C. (1996) **The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos**. *J. Clin. Invest.* 97(8):1788-94.

Pereira, T. **Introdução a técnica de CRISPR**. São Paulo: SBG, 2016.

JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. **2012 A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity**. *Science*. Aug 17;337(6096):816-21

CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU X, JIANG W, MARRAFFINI LA, ZHANG F. 2013 **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems**. *Science*. Feb 15;339(6121):819-23.

CENCIC R & HISASHI. 2014 **Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Distal Sequences Engage CRISPR Cas9 DNA Target Cleavage**. *PLoS ONE* 9 (10): e109213.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., and Joung, J.K. (2013) **Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system**. *Nat. Biotechnol.* 31(3):227-229.

KUMAR TR, WANG Y, LU N, MATZUK MM. 1997 **Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility**. *Nat Genet.*;15:201–204.

KUMAR TR. 2009 **FSH $\beta$  knockout mouse model: a decade ago and into the future**. *Endocrine.*;36:1–5., Google Scholar CrossRef, Medline

ZHANG Z, ZHU B, GE W. 2015a **Genetic Analysis of Zebrafish Gonadotropin (FSH and LH) Functions by TALEN-Mediated Gene Disruption**. *Molecular Endocrinology* 29: 76–98.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Aconselhamento genético 94

Adolescentes 12

Alimento 12

Anacardium occidentale 7, 59, 60, 61, 66, 67

Atividade antioxidante 59, 65

### B

Botânica 1, 3, 10

### C

Clorofila 73, 77

Conteúdo fenólico 59

Crianças 12, 19

Crispr/Cas9 45, 46

### D

Dieta 12

### E

Espermatogênese 45

Estratégias de ensino 1

### F

Ferritina 89

Fragilidade osmótica 27

### L

Lagoa marginal 78

### M

Myracrodruon urundeuva 7, 59, 60, 61, 66, 67

### N

Nutrição 11, 14, 20

## **P**

Piptadenia satipulaceae 23

## **S**

Síndrome de Angelman 7, 93, 94

Síndrome de Down 5, 11, 12, 13, 19, 21

## **T**

Toxicidade 23, 29

Translocação balanceada 7, 93, 94

Trauma cranioencefálico 36, 44

## **Z**

Zebrafish 45, 46, 48, 49, 51, 57, 58

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-540-2



9 788572 475402