

## CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE NORMALIZADOR GAPDH EM PEIXE-REI (*ODONTESTHES HUMENSIS* DE BUEN, 1953)

INGRID MEDEIROS LESSA<sup>1</sup>; WILLIAM BORGES DOMINGUES<sup>2</sup>; TONY LEANDRO SILVEIRA<sup>3</sup>; LUCAS DOS SANTOS DA SILVA<sup>4</sup>; BRUNA FAGUNDES BARRETO<sup>5</sup>; VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [ingridmlessa@hotmail.com](mailto:ingridmlessa@hotmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [williamwwe@yahoo.com.br](mailto:williamwwe@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [tony8.9@hotmail.com](mailto:tony8.9@hotmail.com)

<sup>4</sup>Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [lucassantos\\_17@hotmail.com](mailto:lucassantos_17@hotmail.com)

<sup>5</sup>Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [brunaf.barreto@live.com](mailto:brunaf.barreto@live.com)

<sup>6</sup>Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [fariascampos@gmail.com](mailto:fariascampos@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Diante da demanda de mercado, a produção de pescados vem crescendo nacional e mundialmente nos últimos anos. Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), juntos são responsáveis pela produção média de 70 mil toneladas de peixes/ano, nesse cenário o estado do RS contribui com o cultivo de aproximadamente 30 mil toneladas de peixes de água doce/ano (OSTRENSKY et al., 2007). Para se obter melhores resultados no cultivo de peixes em cativeiro, o conhecimento acerca da fisiologia dos animais cultivados é fundamental, principalmente quanto a variações de salinidade, temperatura e dieta implementada (REY et al., 2016).

Com o avanço da biologia molecular, a análise da expressão gênica tornou-se uma importante ferramenta na compreensão da resposta fisiológica dos organismos frente a variações ambientais, sendo atualmente a técnica de PCR em tempo real (qPCR) o “padrão-ouro” para se quantificar a expressão de genes. Nessa técnica, genes normalizadores (*housekeeping*) são utilizados como parâmetros na comparação com a expressão dos demais genes de interesse (MOREIRA et al., 2011).

Genes normalizadores são expressos igualmente em todas as células dos organismos, independente dos estágios de desenvolvimento e/ou condição fisiológica apresentada pelas mesmas (BASTOLLA, 2007). Especificamente, em peixe-rei (*Odontesthes humensis*), uma das espécies cultivadas no RS e encontrada predominantemente em lagoas costeiras da região sul, até o presente momento não existem trabalhos objetivando a identificação de genes nesta espécie que possam servir como normalizadores. Sendo assim, buscando subsidiar estudos de fisiologia molecular utilizando o peixe-rei como modelo biológico, o presente trabalho teve por objetivo a clonagem molecular e o sequenciamento do gene da GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) para conhecimento de sua estrutura e posterior utilização em ensaios de qPCR em *O. humensis*.

## 2. METODOLOGIA

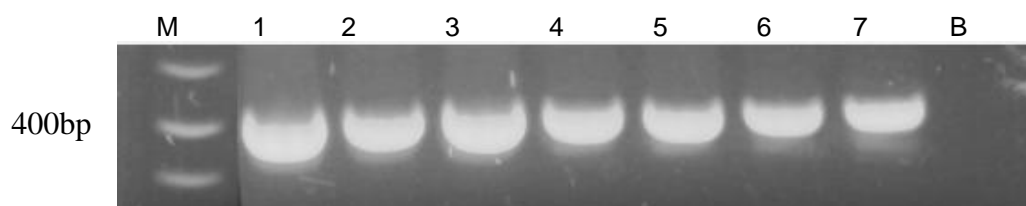
Foram utilizados neste estudo peixes obtidos no Laboratório de Piscicultura da UFPel, Arroio Grande - RS, sendo os mesmos aclimatados durante sete dias (água com pH 7,5 e temperatura de 19°C) com alimentação disponibilizada três vezes ao dia. Após anestesia, os animais foram eutanasiados por secção medular para posterior retirada dos órgãos, os quais foram armazenados em nitrogênio líquido. A extração do RNA foi realizada a partir do tecido hepático, por método de coluna com uso do *kit* comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen, EUA), sendo a amostra de RNA obtida quantificada por espectrofotometria. Posteriormente, a confecção do DNA complementar (cDNA) foi feita com uso do *kit* comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA). A amplificação do gene de GAPDH em *O. humensis* se deu através da PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados com o auxílio da ferramenta *online* PriFi (<http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/PriFi/main>) com base no alinhamento de sequências do mesmo gene de outras espécies, já depositadas em banco de dados público. Em seguida, a definição da temperatura ideal de anelamento dos *primers* se deu por PCR com gradiente de temperatura, variando de 65,5° a 72°C, seguida de eletroforese em gel de agarose 1,2%.

Após a amplificação do gene, o mesmo foi purificado em colunas com membrana de sílica com uso do *kit* comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Health Care, EUA) seguido de eluição em água pura livre de enzimas nucleases. O produto purificado foi submetido ao sequenciamento pelo método de Sanger automatizado e para garantia de um melhor resultado, as amostras foram sequenciadas em duplicata.

O alinhamento das sequências obtidas tornou possível a verificação da identidade da sequência consenso utilizando a ferramenta *online* Basic Local Alignment Search Tool (BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), seguida do depósito da sequência de GAPDH no *GenBank*. Após, realizou-se a caracterização molecular *in silico* com o auxílio da ferramenta *online* InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Os alinhamentos foram realizados pelo método ClustalW. A edição das sequências para deleção de nucleotídeos foi feita com uso do *software* MEGA6. O mesmo programa foi usado para construir as árvores filogenéticas, as quais foram resultantes da aplicação do método de Neighbor-Joining usando bootstrap de 1000 repetições. *Salmo salar* foi utilizado como grupo externo.

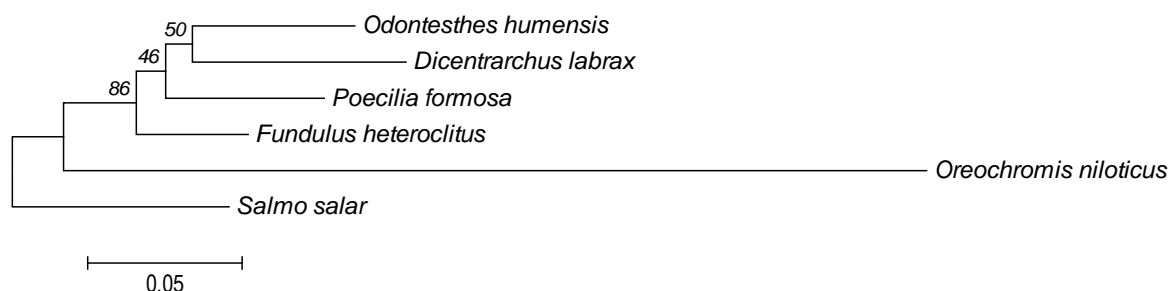
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O alinhamento das sequências de GAPDH resultou no desenho de *primers* *senso* (GTATGACTCCACCCACGGMCG) e *antissenso* (GTAGGCGTGRACKGTGGTCATGAG), os quais quando utilizados em reações de PCR tendo a temperatura de 65,5°C na etapa de anelamento, tornaram possível a amplificação de um fragmento com cerca de 400bp (pares de bases), como constatado por eletroforese em gel de agarose 1,2%, como demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Visualização em gel de agarose dos fragmentos do gene GAPDH de *Odontesthes humensis* amplificados por PCR com gradiente de temperatura. M: marcador de peso molecular; 1: 72°C; 2: 70,8°C; 3: 69,4°C; 4: 68°C; 5: 67,4°C; 6: 66,8°C; 7: 65,5°C; B: controle negativo.

O fragmento amplificado excisado do gel e purificado, apresentou quantidade e qualidade satisfatórias e suficientes para ser submetido ao sequenciamento. A sequência consenso obtida, quando analisada por BLAST, apresentou identidade  $\geq 90\%$  com gene GAPDH de outras espécies de peixes como: *Rachycentron canadum*, *Neolamprologus brichardi*, *Siniperca chuatsi*, *Poecilia formosa* e *Haplochromis burtoni*, indicando o êxito do sequenciamento e tornando possível pela primeira vez o depósito da sequência parcial (325bp) do gene GAPDH de *O. humensis* no banco mundial de sequências gênicas – GenBank, sob o número de acesso KX060038. Quanto à caracterização molecular *in silico* da proteína, a análise indicou que a mesma possui uma região de 108 aminoácidos, correspondente ao domínio do sítio ativo e de ligação da NAD(P). Com relação à análise filogenética deste gene, os resultados obtidos (Figura 2) corroboraram a literatura (BETANCUR et al., 2013), com exceção de *Dicentrarchus labrax*, que deveria ser um grupo externo a *Oreochromis niloticus*. O ideal para análises filogenéticas moleculares fidedignas é a utilização de sequências tão longas quanto possível pertencentes à vários genes. Possivelmente a discrepância constatada se deva à utilização de um único gene (GAPDH) e de sequências incompletas destes.



**Figura 2.** Árvore filogenética baseada nos genes GAPDH de *Odontesthes humensis*, *Dicentrarchus labrax*, *Poecilia formosa*, *Fundulus heteroclitus*, *Oreochromis niloticus* e *Salmo salar*. As sequências gênicas, exceto de *O. humensis*, foram obtidas a partir do GenBank. O número apresentado em cada nó representa o valor de bootstrap em percentagem. A barra indica o número de substituições por sítio de cada sequência.

#### 4. CONCLUSÕES

O sequenciamento do gene GAPDH, presumível normalizador em *O. humensis*, resultou no conhecimento de sua estrutura na espécie estudada. Com isso, estudos envolvendo a exposição de *O. humensis* a condições ambientais adversas poderão ser realizados, utilizando o gene GAPDH como referência na

análise da expressão de outros genes de interesse por meio da técnica de qPCR. Além disso, novos *insights* preliminares sobre as relações filogenéticas de *O. humensis* puderam ser realizados graças ao reconhecimento da sequência nucleotídica do gene GAPDH nessa espécie.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOLLA, F. M. **Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus***. Outubro, 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BETANCUR R. R.; BROUGHTON R. E.; WILEY, E. O.; CARPENTER, K.; LÓPEZ, J. A.; LI C.; HOLCROFT N. I.; ARCILA D.; SANCIANGCO M.; CURETON II J. C.; ZHANG F.; BUSER T.; CAMPBELL M. A.; BALLESTEROS J. A.; ROA-VARON, A.; WILLIS, S.; BORDEN, W. C.; ROWLEY, T.; RENEAU, P. C.; HOUGH D. J.; LU G.; GRANDE, T.; ARRATIA, G.; ORTÍ, G. The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. **PLOS Currents Tree of Life**. 1 Ed., 2013.

MOREIRA, R. S.; LEMOS, E. G. de M.; ABDELNOOR, R. V.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; PEREIRA, S. dos S.; OLIVEIRA, M. C. N. de; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.1, p.58-65, jan. 2011.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, E. D. **Estudo Setorial para Consolidação de uma Aquicultura Sustentável no Brasil**. Curitiba: GIA, 2007.

REY, S.; RIBAS, L.; CAPDEVILA, D. M.; CALLOL, A.; HUNTINGFORD, F. A.; PILARCZYK, M.; KADRI, S.; MACKENZIE, S. Differential responses to environmental challenge by common carp *Cyprinus carpio* highlight the importance of coping style in integrative physiology. **Journal of Fish Biology**, v. 88, p.1056–1069, 2016.