

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE DE REFERÊNCIA HISTONA (h3a) PARA VALIDAÇÃO DE DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR) EM PEIXES-REI (*Odontesthes humensis*, de Buen 1953)

BRUNA FAGUNDES BARRETO¹; TONY SILVEIRA²; LUCAS DOS SANTOS DA SILVA²; INGRID MEDEIROS LESSA²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – brunaf.barreto@live.com

²Universidade Federal de Pelotas - silveira.tlr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lucassantos_17@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ingridmlessa@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – williamwwe@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas– fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica que visa a quantificação absoluta ou relativa dos níveis de transcrição de RNAs mensageiros. A quantificação relativa descreve a mudança no padrão de expressão de genes de interesse quando submetidos a determinadas situações controladas em comparação com a expressão constante de genes de referência. Portanto, é fundamental que o gene de referência mantenha sua expressão inalterada independentemente do sexo, idade, órgãos ou tecidos e mesmo após mudanças ambientais sofridas pelo organismo em estudo. Assim, é necessário validar genes de referência diversos para várias espécies e seus estágios de desenvolvimento em diferentes tecidos, bem como para cada tipo de condição ambiental controlada (TANG et al., 2012; LIVAK et al., 2001). No entanto, isso não é rotineiro em estudos relacionados à quantificação da expressão gênica em várias espécies de teleósteos. A maioria dos estudos utiliza genes de referência devidamente validados em espécies de mamíferos, o que pode levar a resultados ilegítimos.

Dentre os genes de referência, destaca-se o gene da Histona, por ser um componente básico dos nucleossomos, o qual consiste em aproximadamente 146 pares de bases do DNA enovelados ao redor de um octâmero central de proteínas conhecidas como histonas, sendo essas amplamente estudadas em diversas espécies (LI et al., 2011; ONG et al., 2016).

Odontesthes spp. formam um gênero de peixe naturalmente endêmico das águas da América do Sul. Este gênero compreende o maior número de espécies de atherinopsídeos sul-americanos. Na natureza, são geralmente encontrados no sul do Brasil, no Uruguai e na Argentina, nessas regiões, algumas espécies têm importância econômica para a produção, comercialização de carne e pesca esportiva (SOMOZA et al., 2008). Além disso, devido sua origem marinha, é um peixe exigente em termos de qualidade de água, ocupando ambientes de água doce e água salobra, nesse sentido, o mesmo tem sido alvo de estudos evolutivos, de osmorregulação e também de poluições ambientais (MENONE et al., 2000).

Dessa forma, buscando subsidiar estudos futuros em relação a expressão gênica através da técnica da qPCR, considerada “padrão-ouro” para análises moleculares, é notável a necessidade de um gene de referência específico para a espécie *Odontesthes humensis*. Todavia, até o presente momento, não há estudos que elucidem estruturalmente o gene h3a em qualquer espécie de

Odontesthes descrita. Portanto, o objetivo do presente estudo foi clonar e sequenciar o gene de referência h3a, visando seu uso na normalização da técnica qRT-PCR nos futuros estudos realizados pelo grupo de pesquisa.

2. METODOLOGIA

O uso de animais e todas as práticas de manipulação adotadas no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob número de processo 7018/2015-85.

Os animais utilizados no estudo foram mantidos no município de Arroio Grande (RS), no Laboratório de Piscicultura na Barragem do Chasqueiro – UFPel, em tanques de 1000 L, sendo alimentados três vezes ao dia, com controle da qualidade da água. O período de aclimação foi de quatro semanas nessas condições. Por conseguinte, os peixes foram anestesiados com benzocaína, na dose de 50mg/L e posteriormente eutanasiados, através de secção medular e excisão cerebral.

A extração de RNA foi realizada com o reagente comercial TRIzol®, a partir de tecidos de interesse, tais como, brânquias, cérebros, hepatopâncreas e rins. A seguir ocorreu a medição de concentração e pureza das amostras de RNA através de espectrofotometria com luz UV, para posterior confecção do DNA complementar (cDNA) através do *kit* comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA).

Primers foram desenhados com o auxílio da ferramenta *online* PriFi (<http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/PriFi/main>), tendo como base a análise de alinhamentos de sequências gênicas do h3a de outros organismos já depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Para a amplificação do gene, foi utilizado como *template* o cDNA confeccionado. Foram realizadas reações de PCR com gradiente de temperatura na etapa de anelamento dos *primers*. A confirmação da amplificação se deu através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, seguida da purificação do produto, utilizando colunas com membrana de sílica para lavagem e precipitação, sendo o mesmo eluído com água estéril livre de enzimas DNase e RNase. O produto purificado foi posteriormente sequenciado através do método de Sanger automatizado, no Laboratório de Genômica Estrutural do CD Tec - UFPel.

Após, foi realizado o alinhamento das sequências obtidas no sequenciamento, com o auxílio da ferramenta ContigExpress (Vector NTI Software, ThermoFisher Scientific, EUA), obtendo-se, assim, uma sequência consenso do gene. Essa sequência consenso foi submetida à ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de forma a identificar a identidade obtida do gene sequenciado com a h3a de outros organismos já depositados. Além disso, a sequência consenso foi utilizada como base para o desenho de *primers* específicos para análise de expressão gênica, com o auxílio da ferramenta *online* Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de RNA extraídas apresentaram uma concentração média de 600 ± 25 ng/μl e um grau de pureza satisfatório de ≥ 2.0 . Com o auxílio da ferramenta PriFi, foi obtido um par de *primers* senso e antisenso com 19 e 20 nucleotídeos, respectivamente.

A partir das reações de PCR e da visualização em gel de agarose 1,2%, foi possível definir uma temperatura ótima de anelamento dos *primers* de 60 °C, uma vez que amplificou uma única banda com o tamanho esperado, como demonstrado na Figura 1.

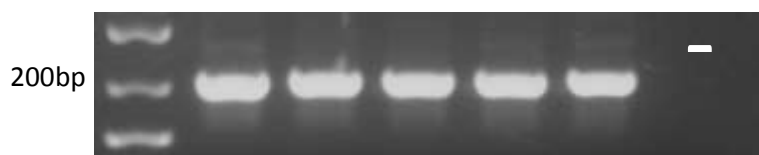


Figura 1. Gel de agarose 1,2% demonstrando o resultado da amplificação do gene h3a em *O. humensis*, no tamanho esperado de 222 pares de base (pb). Na última canaleta, o (-) representa o controle negativo, demonstrando que a reação não foi contaminada com cDNA exógeno.

Após o sequenciamento, obteve-se uma sequência consenso, a qual revelou 99% de identidade com o gene da h3a de *Gazza minuta* (Bloch, 1795), o que viabilizou o depósito do fragmento sequenciado no *GenBank* sob o número de acesso KX060037 (Figura 2).

Odontesthes humensis histone H3 mRNA, partial cds

GenBank: KX060037.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS	KX060037	222 bp	mRNA	linear	VRT 28-JUL-2016
DEFINITION	Odontesthes humensis histone H3 mRNA, partial cds.				
ACCESSION	KX060037				
VERSION	KX060037.1				
REFERENCE	1 (bases 1 to 222)				
AUTHORS	Barreto,B.F., Rezende,T.L.R., Silva,L.S., Lessa,I.M., Domingues,W.B., Collares,T.V., Seixas,F.K., Robaldo,R.B., Dellagostin,O.A. and Campos,V.F.				

Figura 2. Depósito da sequência parcial do gene h3a de *Odontesthes humensis*, no Genbank.

Até o momento, nenhum estudo de genômica estrutural, elucidando a sequência de genes normalizadores, bem como, realizando a validação dos mesmos para técnica de PCR em tempo real, havia sido realizado em nenhuma espécie de peixe-rei.

4. CONCLUSÕES

Até o presente momento, todas etapas de clonagem molecular e sequenciamento do gene h3a foram realizadas com êxito. Como perspectiva, temos a ampliação do estudo, através da análise da expressão gênica de outros genes normalizadores, já clonados pelo nosso grupo de pesquisa, visando a validação do melhor gene de referência para peixes-rei, de forma a subsidiar estudos futuros que envolvam a análise da expressão de genes relacionados aos mecanismos de defesa antioxidante frente à contaminantes biológicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LI, Qimeng et al. Evaluation of potential reference genes for relative quantification by RT-qPCR in different porcine tissues derived from feeding studies. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 3, p. 1727-1734, 2011.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MENONE, M.L et al. PCBs and organochlorines in tissues of silverside (*Odontesthes bonariensis*) from a coastal lagoon in Argentina. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 38, n. 2, p. 202-208, 2000.

ONG, Oselyne T.W; YOUNG, Lauren J.; OLD, Julie M. Evaluation of reference genes for gene expression in red-tailed phascogale (*Phascogale calura*) liver, lung, small intestine and spleen. **PeerJ**, v. 4, p. e2763, 2016. v.4, p. e2552, 2016.

SOMOZA, Gustavo M. et al. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 7, p. 784-793, 2008.

TANG Y kai, YU J hua, Xu P, LI J lin, LI H xia, REN H tao. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*). **Fish & shellfish immunology**, v. 33, n. 4, p. 775-779, 2012.

YANG, Chang Geng et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**, v. 527, n. 1, p. 183-192, 2013.

ZHENG, Wen-jiang; SUN, Li. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 2, p. 638-645, 2011.