

MOLÉCULAS SINTÉTICAS DE DNA PARA PRODUÇÃO DE TILÁPIAS TRANSGÊNICAS TOLERANTES AO FRIO

HADASSA GABRIELA ORTIZ¹; LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES²; EDUARDO BIERHALS BLÖDORN²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; LEANDRO SILVA NUNES²; VINÍCIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – hortizhadassa@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - laisdsantos@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – edu.bblodorn@gmail.com

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

²Universidade Federal de Pelotas – leandro_donfa@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma atividade com baixo impacto ambiental e amplamente explorada no Brasil e no mundo. Além da produção de peixes para o consumo, tem-se também a ampliação de produção para pesquisa científica devido à perspectiva de crescimento da utilização de peixes como biomodelos para pesquisa básica e aplicada nas áreas de biotecnologia, biomedicina, bioengenharias etc.

Atualmente, o peixe mais consumido no mundo é a Tilápia (*Oreochromis niloticus*), o qual tem origem africana e apresenta conformo térmico entre 25 e 28°C, sendo altamente sensível a baixas temperaturas. O Brasil ocupa o 4º lugar no ranking mundial de países produtores de tilápia e aproximadamente 57% da piscicultura brasileira é voltada para a produção desse peixe. Outro ponto forte da piscicultura brasileira reside no seu potencial de exportação de tilápia, que teve um crescimento de 94% de janeiro à abril deste ano. Em 2019 foram produzidos 758.006 toneladas de tilápia no Brasil com cerca de pelo menos 35% da produção localizada na região sul (PEIXE BR). Apesar da ampla produção na região sul, é notável que a tilápia é um peixe que não tolera temperaturas muito abaixo do intervalo de conforto térmico. Posto isso, gera-se a problemática da produção desses peixes em determinadas épocas do ano na região sul, visto que, por volta de 22°C, eles param de comer e, em temperaturas abaixo de 14°C, o ambiente torna-se letal para a espécie.

Sendo assim, tem-se o surgimento da possibilidade de criação de um peixe transgênico para superar as limitações do cultivo de peixes em climas temperados e subtropicais no Brasil. Devido ao período de entressafra no inverno, a tilápia pode ser abatida durante aproximadamente 252 dias por ano (EMBRAPA, 2015). As tilápias são abatidas com tamanho de 900 gramas, sendo que se obtém um rendimento de 32% de filé (Milanez et al., 2019). Desta forma, levando-se em consideração um preço médio do filé que sai do frigorífico de R\$ 20,00 por quilograma, é alcançado um faturamento anual de R\$ 145.152.000,00, com 100.000 indivíduos abatidos por dia (Barroso et al., 2018). Num cenário onde as condições climáticas do inverno não sejam um fator limitante para tilapicultura e, portanto, seja possível que 100.000 indivíduos sejam abatidos por dia ao longo do ano inteiro seria possível um faturamento anual de R\$ 210.240.000,00 representando um incremento de 44,84% na produção. Além disso, alguns avanços na legislação de animais transgênicos permitiram a aprovação da comercialização do salmão transgênico pelo FDA (Food and Drugs Administration) em 2019 nos Estados Unidos a partir da conclusão de que o

salmão transgênico não teve suas características nutricionais alteradas (WATLZ, 2016; BLOCH, 2019).

Desse modo, o presente trabalho tem como finalidade o desenvolvimento de sequências sintéticas de DNA recombinante para a produção de peixes transgênicos, especialmente tilápias, tolerantes ao frio.

2. METODOLOGIA

Para a obtenção das sequências de DNA dos genes de interesse e dos promotores gênicos, foram utilizados o banco de dados GenBank da plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e também artigos que demonstravam a associação de determinados genes à tolerância ao frio. Para a composição da sequência 1 foram utilizados um promotor gênico de expressão dirigida para os músculos de peixes (promotor do gene Mylz2 de Zebrafish) e uma sequência codificadora para expressão da proteína creatina quinase. Em relação à sequência 2, foram utilizadas a sequência de um promotor induzido pelo frio (gene Afp; Anti-freezing protein) de *Macrozoarces americanus* e também a sequência codificadora para a estearil COA desaturase isoforma 2 de *Cyprinus carpio*.

Em seguida, as sequências obtidas tiveram seus códons otimizados para a espécie alvo, *Oreochromis niloticus*, através dos softwares Codon Harmonizer (<http://biocatalysis.uni-graz.at/sites/codonharmonizer.html>) e Codon Optimization (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>). Para a verificação das identidades das sequências otimizadas utilizou-se o software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ademais, as ferramentas BLAST e Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) também foram utilizadas para detectar domínios funcionais que não poderiam ser alterados e também para evitar erros nas sequências das proteínas codificadas.

Sucessivamente, para cada sequência proteica de interesse, foram obtidas pelo menos 5 proteínas ortólogas, de espécies relacionadas, para a execução de um alinhamento múltiplo de sequências com a ferramenta ClustalW (<https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>). Para a visualização do alinhamento e modificação da estrutura da proteína utilizou-se o programa Ugene (Ugene.net). Também foram utilizados os softwares SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html) e PROVEAN (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) para modificações da estrutura proteica e análise *in silico* da tolerância do sítio à substituição.

Posteriormente, utilizou-se o programa Vector NTI (Invitrogen, USA) para a construção das moléculas sintéticas de DNA recombinante. As sequências codificadoras (CDS) foram adicionadas logo após a porção 3' da sequência. Com o intuito de aumentar a expressão gênica da sequência, uma sequência de Kozak foi adicionada entre a sequência promotora e a CDS. Uma sequência de sítio de poliadenilação (PolyA site) foi adicionada na região 3' do códon de terminação da sequência codificadora. Além disso, também foram adicionadas sequências para enzimas de restrição nos flancos da sequência. Enfim, as sequências finalizadas foram testadas nos bancos de dados e também no site PatSeq Finder (<https://www.lens.org/lens/bio/patseqfinder>) a fim de verificar a existência de anterioridade.

Esta construção gênica foi considerada um invento e foi depositada como patente de invenção no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Para isso, foi realizada uma busca de anterioridade nos bancos de patente tais como, INPI, Google patents, Portal capes, USPTO, WIPO e Spacenet. A notificação de

invenção foi submetida à Coordenação de Inovação Tecnológica CIT da UFPel, a qual, posteriormente realizou o depósito sob o número BR1020190246723.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseando-se na metodologia descrita, duas sequências sintéticas de DNA recombinante foram obtidas e adicionadas ao depósito de pedido de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o número BR1020190246723. Todas as análises computacionais indicam que as sequências mantiveram seus sítios funcionais e também suas características de enovelamento, sendo portanto consideradas funcionais. Ainda, as patentes encontradas nas buscas de anterioridade (Tabela 1) baseiam-se em metodologias demoradas, como cruzamentos e análises genéticas, ao invés da inserção de moléculas para a geração de tolerância ao frio. Ademais, com base na busca realizada no site PatSeq finder, as sequências não apresentam anterioridade no banco de dados de sequências depositadas em patentes e portanto a característica de inovação tecnológica se mantém. Contudo, para confirmar a eficiência das sequências desenhadas, testes *in vivo* são necessários.

Tabela 1. Número de documentos encontrados na busca de anterioridades.

Termos de busca	Resultados da busca				
	INPI	Google Patents	Espacenet	USPTO	WIPO
Tilapia	7	10596	7392	1227	1182
Creatina quinase	0	24606	632	5700	1
Músculo; creatina quinase	0	16599	46	908	0
Estearoil-coa dessaturase	6	2.840	412	895	8
creatine kinase AND fish	0	4.397	1120	1009	6554
creatine kinase AND tilapia	0	140	23	4	93
creatine kinase AND carp	0	685	109	106	435
Stearoyl-coa desaturase AND fish	0	650	0	260	1434
Stearoyl-coa desaturase AND tilapia	0	11	6	1	23
Stearoyl-coa desaturase AND carp	0	69	45	56	135
Muscle creatine kinase AND tilapia	0	266	11	10	79
Muscle creatine kinase AND carp	0	993	53	52	403
Creatine kinase OR mck AND expression	0	5580	13108	21	1900
Stearoyl-coa desaturase AND gene expression	0	16587	1483	603	9052

4. CONCLUSÕES

A partir desta pesquisa foi possível desenvolver uma invenção a fim de tentar superar a limitação do cultivo de peixes em climas subtropicais e temperados utilizando-se moléculas de DNA recombinante. As sequências desenvolvidas demonstraram, através de análises computacionais, serem completamente funcionais além de apresentarem a possibilidade de produção via síntese química. De tal modo, as duas sequências sintéticas de DNA recombinante apresentam potencial de aplicação na indústria de produção de peixes transgênicos tolerantes ao frio, mais precisamente tilápias transgênicas, podendo ser transferidas para o setor produtivo, mais especificamente para empresas da área de genética de peixes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELLOS, Leonardo José Gil; FAGUNDES, M. Policultivo de jundiás, tilápias e carpas. Uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense (2a Ed.). Passo Fundo: **Editora da Universidade de Passo Fundo**, 2012. 318 p.

BARROSO, R. M. et al. Diagnóstico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

BLOCH, Sam. **AquAdvantage, the first GMO salmon, is coming to America**. The New Food Economy. 11 março 2019. Acessado em 27 set. 2020. Disponível em: <<https://newfoodeconomy.org/fda-aquabounty-gmo-salmon-seafood-restriction-market/>>

PEIXE BR. **Lançamento Anuário Peixe BR de Piscicultura**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/lancamento-anuario-peixe-br-de-piscicultura-piscicultura-2020/>>. Acesso em: 29 set. 2020.

PEIXE BR. **Tilápia brasileira avança no mercado norte-americano**. 28 maior 2020. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/tilapia-brasileira-avanca-no-mercado-norte-americano/>>. Acesso em: 28 set. 2020.

WALTZ, Emily. GM salmon declared fit for dinner plates. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 7-9, 2016.

MILANEZ, Artur Yabe et al. Potencial e barreiras para a exportação de carne de tilápias pelo Brasil. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2019.