

CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES DE *Austrolebias charrua*

LUCAS NEVES¹; NATIÉLI GONÇALVES²; EDUARDO DELLAGOSTIN³; TONY SILVEIRA⁴; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁵; MARIANA HÄRTER REMIÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – lucas2407@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – goncalves.naty.5@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – edu.ndell@gmail.com

⁴Universidade Federal do Rio Grande – silveira.tlr@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – mh.remiao@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A técnica de *PCR* (*polimerase chain reaction*) quantitativo em tempo real (*real time - qPCR*) é uma variação da técnica de *PCR* que permite quantificação de produtos gênicos de uma amostra. Dentre suas diversas aplicações, está a quantificação de expressão gênica. Genes normalizadores são necessários para a aplicação deste tipo de técnica pois funcionam como um controle de reação interno (SILVEIRA et al., 2018). Tais genes são *locus* gênicos expressos em todas as células de um mesmo tecido sendo, assim, importantes para a correção de variações experimentais (INFANTE et al., 2008). Portanto, para ser considerado como normalizador, um gene deve mostrar expressão não regulada e estável no tipo de amostra analisada (ROMANOWSKI et al., 2007), e possuir sequências diferentes do alvo, além de expressão constante e conhecida.

Dentre os genes normalizadores utilizados, estão o *ef1α* e o *h3f3a*. O gene *ef1α* (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*) codifica para o fator de alongamento 1 α, uma proteína que faz parte do complexo EF1, o qual está envolvido no processo dependente de GTP de entrega de aminoacil-tRNA sintetase para o ribossomo, ou seja, um gene importante para a síntese protéica (BECKER et al., 2013). Já o gene *h3f3a* (*histone H3 family 3 a*) codifica para a proteína histona h3 que é uma proteína componente central do nucleossomo. Tal proteína é importante para compactação do DNA em cromatina, ajudando também na transcrição, reparo do DNA, replicação e a estabilidade cromossômica (CHUBB et al., 2006).

O peixe-anual *Austrolebias charrua* é uma espécie endêmica que vive entre o sul do Brasil e o leste do Uruguai, habitando charcos temporários, no entorno da Laguna dos Patos e Lagoa Mirim (LANES, 2011). Por possuir distribuição endêmica, baixa capacidade de dispersão, rápido ciclo de vida e estar constantemente perdendo habitat devido a ações antrópicas (VOLCAN & LANES, 2018), os peixes-anuais, incluindo *A. charrua*, representam o grupo de peixes com o maior perigo de extinção do Brasil (MMA, 2014).

Sendo assim, devido ao ainda incipiente conhecimento genético-molecular que se tem a respeito de *A. charrua*, o objetivo deste trabalho é apresentar a clonagem, o sequenciamento e a caracterização dos genes *ef1α* e *h3f3a* deste peixe.

2. METODOLOGIA



Peixes adultos da espécie *A. charrua* foram capturados em poças temporárias sob permissão nº 71072 do IBAMA/SISBIO. Os peixes foram mantidos no Biotério Aquático da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), e todos métodos e práticas utilizados foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas e Universidade Federal do Rio Grande (CEEA UFPEL 145/2019 e CEUA FURG P053/2019, respectivamente).

Os animais foram eutanasiados em água gelada (2 °C – 4 °C) durante 10 minutos para coleta de seus tecidos (brânquias e fígado). Os tecidos foram depositados em criotubos e armazenados em nitrogênio líquido até o momento da análise.

Para a análise molecular, foi extraído o RNA dos tecidos utilizando o reagente Trizol (ThermoFisher Scientific, EUA) junto do *kit Pure Link RNA mini kit* (ThermoFisher Scientific, USA) de acordo com o protocolo adaptado de Parthipan et al. (2015). Foi verificada a qualidade e integridade do RNA extraído utilizando espectrofotometria de luz UV com o equipamento NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences, EUA) através da relação de absorção A260/A280≥2.0 nm. Para remover a contaminação do DNA genômico a amostra foi tratada com DNase usando *DNA-free™ Kit Treatment Dnase* (Ambion Life Technologies, EUA) seguindo a recomendação do fabricante. Depois disso, foi utilizado o fluorômetro Qubit® (Invitrogen™, EUA) para nova quantificação e análise de qualidade, e somente as amostras de alta pureza prosseguiram para a reação de transcrição reversa (RT) para confecção de cDNA. O cDNA foi confeccionado utilizando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA).

Os fragmentos dos genes foram então amplificados por PCR utilizando primers desenhados com a ferramenta *online PriFi* (<https://services.birc.au.dk/prifi/>) baseando-se em regiões conservadas de alinhamentos múltiplos de sequências depositadas no GenBank e pertencentes a outros peixes filogeneticamente relacionados à espécie de interesse. As reações de PCR foram incubadas em termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems, EUA), usando *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase mix buffer* (Promega, EUA) seguindo os protocolos do fabricante. Os seguintes parâmetros foram ajustados para o desenvolvimento das reações de PCR: ciclo inicial de 1 minuto a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos intercalados a 35 ciclos de anelamento de 60 a 64.9 °C por 30 segundos e mais 35 ciclos de extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando por um ciclo de 5 minutos a 72°C. Para confirmar a amplificação dos fragmentos, o produto da PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose de 1,5%. Os produtos foram purificados usando E-gel (Invitrogen, EUA) e inseridos em vetor de clonagem pCR®4-TOPO® TA (Invitrogen, EUA). Bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5α eletrocompetentes foram, então, transformadas utilizando tal vetor. Colônias transformadas foram selecionadas para cultura, o plasmídio foi extraído com o *kit Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare, EUA) e purificado.

O material genético foi, então, submetido ao sequenciamento utilizando sequenciador automático Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer® (Life Technologies, EUA) após adição e mistura de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA) às amostras, permitindo as reações de amplificação diferenciada necessárias ao sequenciamento.

Análises *in silico* foram realizadas para caracterizações de ambos os genes. Para isso, foram utilizadas as ferramentas *ORF finder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) e *ExPASy portal* (<https://web.expasy.org/translate/><https://www.expa sy.org/>). O banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>) foi usado para predição de sítios e domínios conservados.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências geradas foram depositadas no GenBank sobre os códigos de acesso MW960433 e MW960436 (para *ef1α* e *h3f3a*, respectivamente).

Quanto às análises *in silico*, foi encontrado para o gene *ef1α* que a região sequenciada se encontra na ORF -2 e codifica para 215 aminoácidos que pertencem à proteína fator de alongamento 1α. O fragmento entre os aminoácidos 1 e 215 tem duas ligações para nucleotídeos: 48 até 52 e 110 até 113, com um domínio nos aminoácidos 1 ao 199.

O sequenciamento do fragmento do gene *h3f3a* que passou pelo processo de clonagem molecular e resultou em uma sequência parcial com 284 nucleotídeos. O fragmento clonado e sequenciado de *h3f3a* pertencem ao ORF +1, além disso, o fragmento codifica para 94 aminoácidos e pertence à família Histona H3.

Caracterizar as sequências gênicas de espécies ainda pouco exploradas molecularmente se faz muito importante por diversos motivos, dentre eles, a possibilidade de investigação filogenética (PANDEY et al., 2020). A filogenia molecular permite a verificação de relação entre espécies através da estrutura das moléculas como, por exemplo, as sequências nucleotídicas.

Ainda, conhecer a estrutura de genes normalizadores de *A. charrua* se faz importante para o desenvolvimento de análises de expressão gênica voltadas a essa espécie através da técnica de *real time - qPCR* (GONZALEZ, 2008; PAPA, 2019). Para tanto, a pesquisa por genes que possam ser usados para a normalização dessa técnica é imprescindível. Análises de expressão gênica diferencial podem ser importantes, por exemplo, para o desenvolvimento de estratégias de aplicação de espécimes de *A. charrua* como bioindicadores de qualidade de água usando genes como biomarcadores. Além disso, essas análises são importantes também para o conhecimento do comportamento de certos genes frente a mudanças ambientais, estágio de desenvolvimento, dentre outras situações que levam à alterações fisiológicas.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho relata a clonagem, o sequenciamento e a caracterização de sequências parciais dos genes *ef1α* e *h3f3a* de *A. charrua*. Tal conhecimento é importante a fim de abrir portas para análises de filogenia molecular e análises de expressão gênica desta espécie.

A partir deste trabalho, novas abordagens podem ser pesquisadas, como uso desses peixes como bioindicadores de qualidade de água. Estudos de expressão diferencial por *real-time qPCR* podem vir a ser mais explorados para melhor compreensão de processos prejudiciais, ou não, à fisiologia normal de *A. charrua*, uma espécie ameaçada de se perder sem que a conheçamos suficientemente bem.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER M., KUHSE J., KIRSCH J. Effects of two elongation factor 1A isoforms on the formation of gephyrin clusters at inhibitory synapses in hippocampal neurons. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 603 – 609, 2013.



CHUBB, J. R. et al. Developmental timing in *Dictyostelium* is regulated by the Set1 histone methyltransferase. **Developmental biology**, v. 292, n. 2, p. 519-532, 2006.

GONZALEZ, L. P. Análisis morfogenético de la gastrulación em peces teleosteos anuales del gênero *Austrolebias*. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Escola de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Universidade do Chile.

INFANTE, C. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 9, n. 28, 2008.

LANES, L. Dinâmica e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no Parque Nacional da Lagoa do Peixe. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Biologia, UNISINOS.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE), PORTARIA MMA Nº 445, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014 — Português. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/portaria-mma-no-445-de-17-12-2014.pdf>>. Acesso em: 01/04/21

PANDEY P. K. et al. DNA barcoding and phylogenetics of freshwater fish fauna of Ranganadi River, Arunachal Pradesh. **Gene**. 2020 Sep v. 5, n 754, p. 144860, 2020.

PAPA, N. G. et al. Annual killifish: an approach to the choriogenins of *Austrolebias charrua* egg envelope. **Environmental Biology of Fishes**, v. 102, n. 6, p. 829-844, 2019.

PARTHIPAN, S., et. al. Spermatozoa input concentrations and RNA isolation methods on RNA yield and quality in bull (*Bos taurus*). **Analytical Biochemistry**, v. 482, p. 32–39, 2015.

ROMANOWSKI, T. et al. Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR. **Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej (Online)**, v. Sep, n. 61, p. 500-510, 2007.

SILVEIRA, T. L. R. et. al. Evaluation of reference genes to analyze gene expression in silverside *Odontesthes humensis* under different environmental conditions. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. 75, 2018.

VOLCAN, M. V. & LANES, L. E. K., Brazilian killifishes risk extinction. **Science**, v. 361, p. 340–341, 2018.