

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE β -ACTINA EM PEIXE-ANUAL *Austrolebias charrua*

LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS¹; MARIANA CAVALCANTI NASCIMENTO²;
LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES²; LUCAS PETITEMBERTE SOUZA²;
ANTÔNIO DUARTE PAGANO²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – luanafvreis@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – marianacbiotec@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – laisdsantosg@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – lucasouza.contato@gmail.com

²Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – antonioduarteapagano@gmail.com

³Lab. Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os peixes-anuais, ou popularmente conhecidos como peixe do céu, peixe da poça, ou peixe nuvem representam o grupo de peixes continentais com maior risco de extinção no Brasil. Esta vulnerabilidade está associada principalmente a perda do seu habitat, distribuição endêmica e baixa capacidade de reprodução (VOLCAN; LANÉS, 2018). O seu habitat costuma ser poças temporárias, que não possuem qualquer ligação com outros cursos d' água, elas são formadas ao longo da estação chuvosa e seca no decorrer da estação de seca. Conhecidos também pelo seu curto ciclo de vida, onde durante o período de cheia os embriões desses peixes se desenvolvem, eclodem, crescem, maturam e se reproduzem. Enquanto que durante a seca, a maior parte da população adulta é levada à morte, restando apenas os embriões, que são resistentes à dessecação (BEROIS et al., 2015).

Entendendo isto, o *Austrolebias charrua* é a espécie mais estudada, dentre os peixes-anuais, do gênero *Austrolebias*, e se distribui exclusivamente desde o sul do Brasil até o leste do Uruguai (BEROIS et al., 2015). Além disso, esta espécie é uma das que mais corre o risco iminente de desaparecer do território brasileiro. Alguns dos fatores antrópicos que contribuem para o declínio progressivo dos peixes-anuais, estão a urbanização, destruindo os habitats; construção de hidrelétricas; e a agricultura extensiva, principalmente a orizicultura e a sojicultura, devido a utilização excessiva de pesticidas (VOLCAN; LANÉS, 2018). Em razão dessa vulnerabilidade, estes peixes estão protegidos pelo Plano de Ação Nacional para Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção (PAN Rivulídeos). Também aparecem como espécies-chave para acompanhamento e proteção da família Rivulidae no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2018).

Diferentes tecnologias genômicas vêm sendo empregadas no monitoramento ambiental de espécies silvestres, incluindo PCR quantitativa (qPCR). Esta é uma das técnicas mais utilizadas para a análise relativa de RNA mensageiro (mRNA) pela rápida leitura, excelente eficiência e grau de automatização (TANG et. al., 2012). Entretanto, pouco se entende a respeito da genômica dos peixes-anuais, sobretudo aspectos relacionados à expressão de genes e fatores ambientais que influenciam estas espécies a nível molecular, bem como é escassa a disponibilidade de sequências gênicas de *A. charrua* em bancos de dados genômicos. Isto representa um obstáculo para o emprego de tecnologias de análise de expressão gênica como a qPCR, haja visto que a

utilização desta técnica pressupõe a caracterização espécie-específica dos marcadores moleculares a serem analisados.

Assim, o sequenciamento de genes de referência (genes normalizadores ou genes constitutivos) torna-se o primeiro passo para o emprego da qPCR na espécie *A. charrua*, uma vez que normalizadores representam o controle endógeno desta técnica. Neste sentido, o presente trabalho objetivou clonar e sequenciar o gene β -actina (*actb*) em peixe-anual *A. charrua*, a fim de prospectar a utilização deste gene como um normalizador em futuras análises de expressão gênica pela técnica de qPCR nesta espécie.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta dos animais e condições de criação

Para este experimento foram coletados dois indivíduos da espécie *Austrolebias charrua* em fase adulta, com o auxílio de uma rede passaguá de malha 4mm, em campos costeiros próximos a orla da praia do Cassino, localizado no município de Rio Grande (32°2'6"S, 52°5'56"O). A coleta foi efetuada sob o alvará do IBAMA/SISBIO 71072. Os peixes foram transportados para tanques com água ambiente, e encaminhados para o Biotério Aquático da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foram aclimatados e mantidos por 3 semanas sob condições de criação padronizadas anteriormente até a futura extração dos tecidos (VOLCAN et al., 2013). A utilização dos animais e todas as práticas de manejo foram aprovadas pelos comitês de ética em experimentação animal (CEEA UFPEL 145/2019 e CEUA FURG P053/2019).

2.2. Coleta do tecido (brânquia), extração de RNA e síntese de cDNA

Os animais foram submetidos ao choque térmico com água e gelo até a perda total do equilíbrio para eutanásia. Assim, amostras das brânquias e fígado foram coletadas, acondicionadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido (N₂). Por conseguinte, o RNA das amostras foi extraído por cromatografia de troca iônica usando PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA). Após, o RNA foi quantificado e avaliado em termos de pureza (razão A260/A280) usando o espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, USA). A confecção de DNA complementar (cDNA) foi realizada usando kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA).

2.3. Clonagem molecular

Este estudo objetivou clonar o gene β -actina (*actb*). Para clonagem molecular do gene candidato, o alinhamento de sequências de espécies filogeneticamente próximas à *A. charrua* e o desenho dos primers foram realizados na ferramenta online PriFi (<https://services.birc.au.dk/prifi/>). O cDNA confeccionado e os primers foram utilizados nas PCRs, onde foi usado o mix buffer GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). A amplificação clonal dos fragmentos gênicos ocorreu em termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems, USA), e confirmada via eletroforese em gel agarose. Para o subsequente sequenciamento de genes, a purificação dos produtos da PCR foi realizada através de gel eletrônico E-Gel™ EX Agarose Gels (Invitrogen, USA).

2.4. Sequenciamento

As amostras purificadas a partir do E-Gel foram, então, submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger automatizado. Para amplificação das regiões de interesse dos genes a serem sequenciados, foi usado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA). As amostras purificadas foram dispostas em placas de 96 poços contendo a solução de amplificação, primers específicos, e dNTPs e ddNTPs, ao passo que as placas foram incubadas em termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems, USA). Para a purificação da reação de amplificação, foi usado o kit BigDye® XTerminator™ Purification (Applied Biosystems, USA). Assim, o sequenciamento foi realizado no equipamento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer® (Life Technologies, USA). Por fim, as sequências foram depositadas no banco de dados internacional GenBank®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido ao perigo iminente de extinção dos peixes anuais, a compreensão sobre a genômica estrutural e funcional se torna fundamental para a preservação da espécie. Neste sentido, a clonagem e o sequenciamento do gene *actb* para ser empregado como normalizador na técnica de qPCR impulsiona o desenvolvimento futuro de ferramentas moleculares aplicadas ao monitoramento e conservação ambiental desses peixes. Haja visto que os primers desenhados para clonagem deste gene apresentaram alta especificidade ao fragmento gênico de interesse, o gene *actb* foi clonado e sequenciado com sucesso (Figura 1).

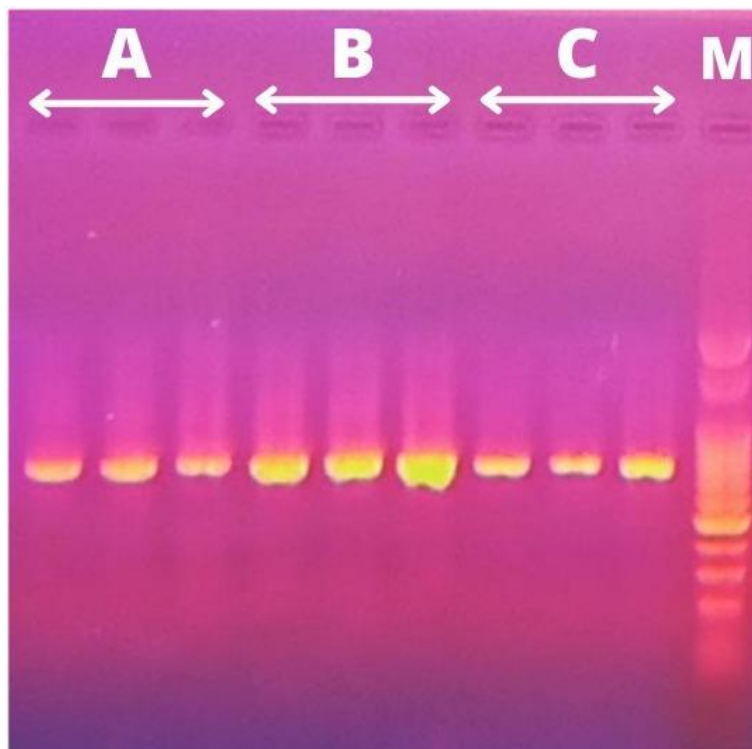


Figura 1. Clonagem e sequenciamento do gene *actb*. **A** - Amplificação clonal na Tm de 60°C; **B** - Amplificação clonal na Tm de 62°C; **C** - Amplificação clonal na Tm de 64°C; **M** - Marcador molecular 100pb.

Para a clonagem molecular, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (T_m) para os primers engenheirados (60, 62 e 64°C). Com base na resolução das bandas, conforme observado em gel de agarose 1,2%, a T_m de 64°C foi selecionada para a PCR e subsequente purificação para sequenciamento. Após a caracterização nucleotídica do gene *actb*, a sequência foi depositada no banco de dados genômico GenBank sob número de acesso ON212043.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho viabiliza o incremento significativo sobre a genômica estrutural de peixes-anuais. Desta forma, uma vez que esses animais representam o grupo de peixes com maior risco de extinção no Brasil, a partir da clonagem e sequenciamento do gene *actb* em peixe-anual *A. charrua*, abrem-se diversas possibilidades de desenvolvimento de ferramentas moleculares baseadas em qPCR com potencial biotecnológico no monitoramento ambiental destas espécies ameaçadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEROIS, Nibia; GARCIA, Graciela; DE SÁ, Rafael O. (Ed.). **Annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution**. CRC Press, 2015.

ICMBIO. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI – Peixes**, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Ministério do meio ambiente. 1235 p. Brasília. 2018.

TANG, Yong-kai et al. 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.

VOLCAN, Matheus Vieira; LANÉS, Luis Esteban Krause. Brazilian killifishes risk extinction. **Science**, v. 361, n. 6400, p. 340-341, 2018.