

## PROSPECÇÃO DE UM PAINEL DE GENES NORMALIZADORES PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR EM PEIXES-ANUAIS *Austrolebias charrua*

ANTÔNIO DUARTE PAGANO<sup>1</sup>; MABELLE CARDIA NUNES DOS SANTOS<sup>2</sup>;  
WILLIAM BORGES DOMINGUES<sup>2</sup>; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA<sup>2</sup>;  
MARIANA HÄRTER REMIÃO<sup>2</sup>; VINICUS FARIAS CAMPOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [antonioduartepagano@gmail.com](mailto:antonioduartepagano@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mabellecardia@gmail.com](mailto:mabellecardia@gmail.com)

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

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande – [silveira.tlr@gmail.com](mailto:silveira.tlr@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mariana.remiao@ufpel.edu.br](mailto:mariana.remiao@ufpel.edu.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fariascampos@gmail.com](mailto:fariascampos@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Os peixes-anuais representam o grupo de peixes com maior risco de extinção no Brasil. Estes animais de curto ciclo de vida habitam charcos temporários que se formam durante as estações chuvosas, seguido de estações secas que acabam por dessecar estes pequenos ecossistemas temporários (BEROIS et al., 2015). Porém, para sobrevivência nos charcos efêmeros, os ovos destes peixes utilizam do mecanismo de diapausa para resistir a dessecação. Assim, enterrados na lama, os ovos estacionam o seu desenvolvimento embrionário até a formação de novos charcos, quando eclodem ao estágio de larva (VOLCAN; LANÉS, 2018).

Nesta perspectiva, *Austrolebias charrua* (*A. charrua*) é uma espécie de peixe-anual endêmica ameaçada de extinção, distribuindo-se desde o sul do Brasil até o leste do Uruguai (BEROIS et al., 2015). Esta espécie encontra-se sob proteção do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos (PAN Rivulídeos). O principal fator antrópico que ameaça a manutenção e sobrevivência de *A. charrua* no ambiente é a expansão da agricultura extensiva, sobretudo orizicultura e sojicultura, que determina a perda das áreas alagadas, bem como a contaminação dos charcos através do uso irresponsável de pesticidas agrícolas, como o herbicida glifosato (ICMBIO, 2018; VOLCAN; LANÉS, 2018;).

Neste sentido, ainda que as modernas tecnologias genômicas estejam sendo largamente empregadas em modelos aquáticos, muito ainda falta a ser entendido sobre a genômica de peixes silvestres, sobretudo aspectos relacionados à expressão dos genes e os fatores ambientais que influenciam as espécies a nível molecular. Também, a não disponibilidade em bancos de dados genômicos de sequências nucleotídicas de peixes selvagens como *A. charrua* representa um entrave para o emprego de técnicas de verificação dos níveis de expressão gênica, como a PCR quantitativa (qPCR). Esta metodologia é considerada padrão-ouro para análise da expressão relativa de RNA mensageiro (mRNA) pela rápida leitura, alta eficiência e alto grau de automatização (TANG et al., 2012).

Na qPCR, para análise da quantificação relativa da expressão de mRNAs de genes de interesse durante situações experimentais controladas, compara-se o padrão de expressão dos genes-alvo à expressão constante dos genes de referência (genes normalizadores ou genes constitutivos) (SILVEIRA et al., 2018). Assim, uma vez que a utilização desta técnica predispõe o conhecimento exato da sequência nucleotídica espécie-específica dos genes a serem analisados, o sequenciamento genômico de genes normalizadores de *A. charrua* torna-se o primeiro passo para futuras análises da expressão gênica de biomarcadores genômicos por qPCR.

Desta forma, a partir da clonagem molecular e sequenciamento de sete genes normalizadores de peixes-anaís *A. charrua*, o presente trabalho objetivou prospectar o desenvolvimento de um painel de genes de referência para ser empregado em análises de expressão gênica pela técnica de qPCR.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Coleta dos animais e condições de criação

Cinco indivíduos da espécie *Austrolebias charrua* em estágio adulto foram coletados em poças temporárias através do uso de puçás de malha 4mm, em campos costeiros próximos a orla da praia do Cassino, no município de Rio Grande (32°2'6"S, 52°5'56"O). A coleta foi realizada sob alvará IBAMA/SISBIO 71072. Os espécimes foram transferidos para tanques com água do ambiente, e transportados até o Biotério Aquático da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foram mantidos durante 3 semanas sob condições de criação previamente estabelecidas até a futura extração dos tecidos (VOLCAN et al., 2013). O uso animal e todas as práticas de manejo foram aprovadas por comitês de ética em experimentação animal (CEEA UFPEL 145/2019 e CEUA FURG P053/2019).

### 2.2. Coleta dos tecidos, 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 de cérebro, brânquias e fígado foram coletadas, acondicionadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). 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 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) 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 de genes normalizadores

Este estudo objetivou clonar sete genes normalizadores de peixes-anaís *A. charrua*, sendo estes: RNA ribossômico 18s (18s);  $\beta$ -actina (*actb*); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*); *short-stature homeobox* (*shox*); fator de alongamento 1- $\alpha$  (*ef1 $\alpha$* ); subunidade G do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica (*eif3g*); e histona h3a (*h3a*). Para clonagem molecular dos genes candidatos, 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 dis-

postas 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® X Terminator™ 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

Uma vez que peixes-anaís encontram-se criticamente em perigo de extinção, é necessário elucidar aspectos relacionados a genômica estrutural e funcional destas espécies. Nesta perspectiva, através do sequenciamento de um grupo de genes de referência para ser empregado na técnica de qPCR, este trabalho impulsiona a genômica aplicada ao monitoramento ambiental (Tabela 1). Então, visto que os normalizadores não possuíam sua sequência nucleotídica caracterizada, realizamos a clonagem molecular destes genes. Uma vez que os primers engenheirados apresentaram alta especificidade aos fragmentos de interesse, os sete genes candidatos foram clonados com sucesso (Figura 1).

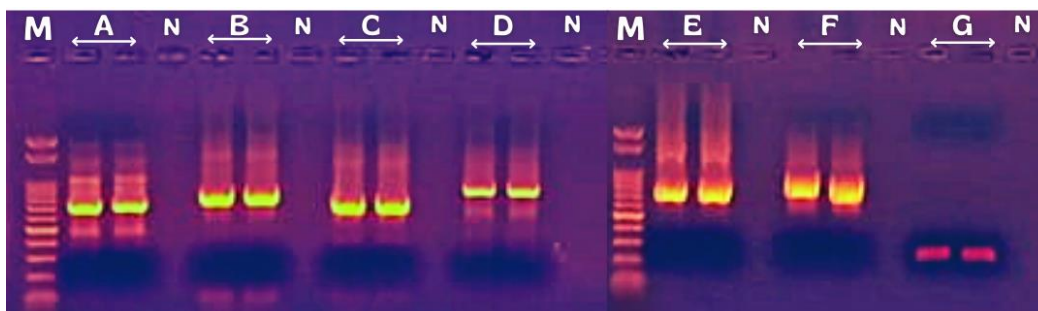
**Tabela 1.** Sumário dos genes normalizadores candidatos.

Gene	T <sub>m</sub> média (°C)/ Amplicon (pb)	GenBank accession
18s	64°C / 733pb	ON243868
actb	62.5°C / 721pb	ON212043
gapdh	64°C / 719pb	ON212047
shox	62°C / 836pb	ON212048
ef1α	64°C / 892pb	ON212045
ef3g	62°C / 802pb	ON212046
h3a	66°C / 241pb	ON245197

Assim, a clonagem molecular e subsequente sequenciamento de sete genes constitutivos de peixes-anaís *A. charrua* viabilizaram a prospecção de um painel de genes de referência. Já que genes normalizadores atuam como controle endógeno da reação de qPCR, o presente trabalho gera subsídios para futuras análises de expressão gênica em peixes-anaís. Nesta perspectiva, a caracterização a nível genômico destas espécies facilita o direcionamento de medidas de conservação e monitoramento ambiental, a partir de ferramentas moleculares inovativas.

Neste sentido, a partir do painel de genes normalizadores desenvolvido para análise de expressão gênica por qPCR, torna-se possível a análise da expressão relativa de biomarcadores genômicos nesta espécie; bem como prospectar o desenvolvimento futuro de uma plataforma de biomonitoramento ambiental de peixes-anaís baseada em marcadores moleculares. Isto possui extrema relevância em ecotoxicologia, uma vez que a exposição à herbicidas agrícolas representa um dos principais fatores que determinam a manutenção e sobrevivência no ambiente de peixes-anaís *A. charrua* (ICMBIO, 2018). Desta forma, por meio da análise de respostas biológicas a nível genômico durante situações ambientais adversas, utili-

zando estes peixes como bioindicadores de poluição ambiental, seria possível determinar a qualidade de um ecossistema aquático, neste caso, os charcos temporários onde habitam os peixes-anauais.



**Figura 1. Clonagem molecular de genes normalizadores. A-** gene *eif3g*; **B-** gene *shox*; **C-** gene *gapdh*; **D-** gene *ef1α*; **E-** gene *18s*; **F-** gene *actb*; **G-** gene *h3a*; **M-** marcador molecular 100pb; **N-** controle negativo.

#### 4. CONCLUSÕES

A prospecção de um painel de sete genes normalizadores para análise da expressão gênica por qPCR, em peixes *A. charrua*, viabiliza o incremento significativo no conhecimento sobre a genômica, fisiologia e zootecnia destes animais. Assim, especialmente no cenário dos peixes-anauais, o grupo de peixes continentais mais ameaçado do Brasil, a partir deste trabalho abrem-se diversas possibilidades de desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras aplicadas ao monitoramento ambiental destas espécies. Como perspectivas, estima-se analisar a expressão gênica dos sete normalizadores durante situações de poluição ambiental por herbicidas pela técnica de qPCR, a fim de determinar quais são os genes candidatos mais adequados para normalização correta dos dados de expressão gênica, a partir de análises *in silico* da estabilidade dos normalizadores.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEROIS, N.; GARCÍA, G.; DE SÁ, R. O. Annual Fishes - Life History Strategy, Diversity, and Evolution. **CRC Press**, New York, 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.

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, 2018.

TANG, Y. KAI et al. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 775–779, 2012.

VOLCAN, M. V.; LANÉS, L. E. K. Brazilian killifishes risk extinction. **Science**, v. 361, n. 6400, p. 340–341, 2018.