

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

MARIANA CAVALCANTI NASCIMENTO¹; ANTÔNIO DUARTE PAGANO²;
VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹ Universidade Federal de Pelotas – marianacbiotec@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – antonioduartepagano@gmail.com;

³ Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os peixes-anuais são um dos grupos de peixes que sofrem com maior risco de extinção no Brasil. Eles possuem ciclo de vida curto e habitam charcos efêmeros que são gerados durante estações chuvosas, acompanhados por estações secas que definem estes ecossistemas (BEROIS et al., 2015). Neste sentido, *Austrolebias charrua* (*A. charrua*) é um exemplo de peixe-anual encontrado desde o sul do Brasil ao leste do Uruguai (BEROIS et al., 2015). A expansão da agricultura extensiva é o principal fator antrópico que induz a perda de áreas inundadas, principalmente pelo uso imprudente de pesticidas agrícolas, como o glifosato (ICMBIO, 2018; VOLCAN; LANÉS, 2018;), ameaçando a sobrevivência da espécie. Além disso, a escassez de bancos de dados genômicos de sequências nucleotídicas de peixes selvagens como *A. charrua* representa um grande obstáculo para a utilização de técnicas para analisar os níveis de expressão gênica, como a RT-qPCR. RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) é a técnica padrão-ouro para análise da expressão gênica de mRNA. Ela se destaca pela leitura rápida, alto rendimento e alto potencial de automação (Tang et al., 2012). Um dos principais genes de referência de mamíferos que têm sido usados empiricamente para normalizar experimentos em espécies de teleosteos é o *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (Lin et al., 2004). À vista disso, o presente trabalho visou clonar e sequenciar o gene *gapdh* em peixe-anual *Austrolebias charrua*.

2. METODOLOGIA

Coleta dos animais e condições de criação

Foi realizada a coleta de 2 indivíduos da espécie *A. charrua* em poças temporárias nos campos costeiros adjacentes à orla da praia do Cassino, no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (32°2'6"S, 52°5'56"O). O procedimento foi realizado com o auxílio de varreduras com puçás com aberturas de malha 4 mm. Antes de serem conduzidos ao Biotério Aquático da FURG, os animais foram movidos para tanques com água coletada no ambiente e adequadamente aerada. Após o transporte, foram aclimatados durante 3 semanas de acordo com as condições definidas por VOLCAN e colaboradores (2013).

Coleta dos tecidos, extração de RNA e síntese de cDNA

Os animais foram expostos ao choque térmico provocado por água e gelo visando eutanásia. Foram recolhidas amostras de brânquias, e logo depois, dispostas em criotubos para armazenamento em nitrogênio líquido (N₂). Utilizou-se a técnica de cromatografia de troca iônica para extração de RNA das amostras através do PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA). O RNA foi então mensurado e qualificado quanto a sua pureza (razão A260/A280) por meio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, USA). Foi administrado DNase nas amostras, enquanto a preparação de DNA complementar (cDNA) foi executada usando kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA), em reações com volume final de 20 µL, de acordo com as orientações do fabricante.

Clonagem molecular

O alinhamento de sequências de espécies filogeneticamente próximas à *A. charrua* e o desenho de primers específicos foi realizado na ferramenta online Prifi (<https://services.birc.au.dk/prifi/>). O cDNA confeccionado e os primers foram utilizados nas PCRs, em que foi utilizado o mix buffer GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). A amplificação dos fragmentos gênicos foi feita em termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems, USA), e confirmada pela eletroforese em gel agarose. Para o sequenciamento, o produto da PCR foi purificado através de gel eletrônico E-Gel™ EX Agarose Gels (Invitrogen, USA).

Sequenciamento

As amostras purificadas foram sequenciadas pelo método de Sanger automatizado e arranjadas em placas de 96 poços, incubadas em termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems, USA). As placas continham a solução de amplificação, primers específicos, e dNTPs. Para a purificação da reação de amplificação, foi usado o kit BigDye® XTerminator™ Purification (Applied Biosystems, USA). Desta forma, o sequenciamento foi executado no equipamento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer® (Life Technologies, USA). A sequência do gene *gapdh* foi então depositada no banco de dados internacional GenBank®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É de extrema importância analisar todas as informações referentes à genômica estrutural desta espécie, principalmente levando em consideração o perigo de extinção que peixes-anaís têm sofrido. Para tal fim, este trabalho estimula o estudo da genômica aplicada ao monitoramento ambiental através do sequenciamento do gene *gapdh* para ser usado na técnica de qPCR.

Os normalizadores atuam como controle endógeno da reação de qPCR, e por tal razão o presente trabalho gera subsídios para futuras análises de expressão gênica em peixes-anauais. É possível concluir que a caracterização a nível genômico destas espécies pode facilitar o rumo de medidas de conservação e controle ambiental. Desta forma, torna-se possível o desdobramento de plataformas de biomonitoramento ambiental de peixes anuais fundamentada em marcadores moleculares. Isto possui extrema relevância em ecotoxicologia, dado que herbicidas agrícolas caracterizam um dos principais agentes determinantes na conservação do ambiente de peixes-anauais *A. charrua* (ICMBIO, 2018).

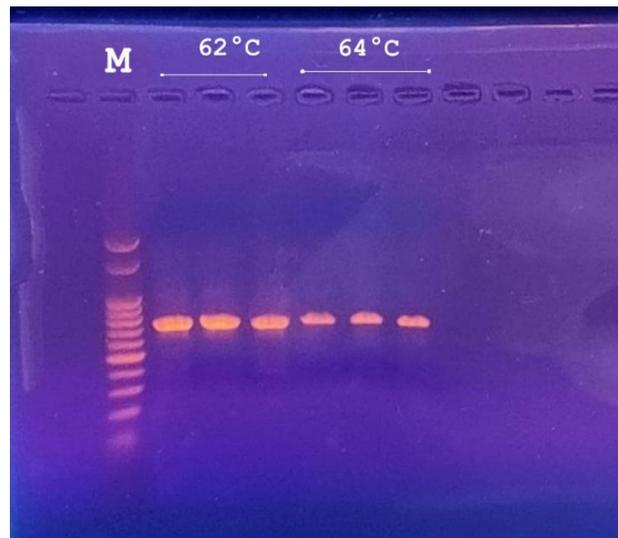


Figura 1. Clonagem molecular do gene *gapdh*. **M** - marcador molecular 100pb; **A** - amplificação na Tm de 62°C; **B** - amplificação na Tm de 64°C.

4. CONCLUSÕES

Considerando, principalmente, as circunstâncias perigosas em que os peixes anuais se encontram, este trabalho impulsiona o desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras de monitoramento ambiental de peixes-anauais com base na técnica de qPCR. Como perspectivas, espera-se analisar, por exemplo, o efeito de poluentes ambientais como os pesticidas na expressão gênica, usando *A. charrua* como um indicador de poluição ambiental, e a subsequente avaliação *in silico* da estabilidade deste gene como normalizador em peixe-anual *Austrolebias charrua*.

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.