

# AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO (HSP70) EM PEIXE-REI (*Odontesthes humensis* DE BUEN, 1953)

BARRETO, Bruna; CAMPOS, Vinicius (orientador)

Laboratório de Genômica Estrutural - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Campus Capão do Leão, RS, Brasil

\* Autor para correspondência: Tel. (53) 81497716  
E-mail: brunaf.barreto@live.com



## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As proteínas de choque térmico (HSPs) têm como principal função o enovelamento proteico e a manutenção da estrutura frente à variação térmica no organismo. Pouco sabe-se sobre as funções da HSP70 em peixes submetidos a variações de cultivo. *Odontesthes humensis* ocorre com frequência no sul da América do Sul. Porém, a alta exigência por qualidade de água tem dificultado seu cultivo. Visando subsidiar estudos futuros sobre fisiologia e manejo, o estudo teve por objetivo a clonagem, o sequenciamento e a análise da expressão gênica do gene HSP70 em peixes-rei quando submetidos ao herbicida Roundup®, um dos principais contaminantes que podem atingir os corpos d'água através da lixiviação agrícola.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Animais

Os peixes utilizados neste estudo foram obtidos no Laboratório de Piscicultura da UFPel, Arroio Grande – RS. Após aclimação, os animais foram anestesiados e posteriormente realizou-se a eutanásia para a retirada dos órgãos, os quais foram armazenados em nitrogênio líquido.

### 2.2. Extração de RNA

Realizou-se a extração do RNA a partir de tecidos branquiais através de *kit* comercial baseado em método de coluna com membrana de sílica.

### 2.3. Confeção de cDNA

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria e em seguida, utilizado como base para confeção de DNA complementar (cDNA) utilizando o *kit* comercial *High Capacity* (Applied Biosystems, EUA).

### 2.4. Clonagem e sequenciamento do gene da HSP70

A amplificação da HSP70 foi realizada através de RT-PCR, utilizando *primers* desenhados com a ferramenta *on-line PriFi* com base em alinhamentos de seqüências da HSP70 de outras espécies obtidas no *GenBank*. A verificação da temperatura ideal de anelamento dos *primers* foi feita por PCR com gradiente de temperatura. A confirmação da amplificação se deu através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, seguida da purificação do produto, o qual foi sequenciado por método de Sanger automatizado, permitindo o desenho de *primers* para análise da expressão gênica da HSP70.

### 2.5. Análise da expressão gênica da HSP70

A análise se deu através de RT-qPCR pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando o gene da  $\beta$ -Actina como normalizador, sendo comparadas amostras de animais expostos por 9 dias a 1 mg/L de glifosato e amostras controle (0 mg/L de glifosato).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Extração de RNA e confeção de cDNA

O RNA extraído apresentou concentração média de 600ng/ $\mu$ l e uma razão A260/A280  $\geq 2$ , apresentando condições ideais para confeção do cDNA.

### 3.2. Clonagem e purificação

A partir de reações de PCR e da visualização em gel de agarose, foi possível eleger uma temperatura ótima de anelamento dos *primers* de 61°C (Fig. 1). Após excisão e purificação a partir banda contendo o fragmento de DNA amplificado, a quantificação do produto final apresentou relação A260/280  $> 1.8$ , indicando qualidade ideal para ser sequenciado.

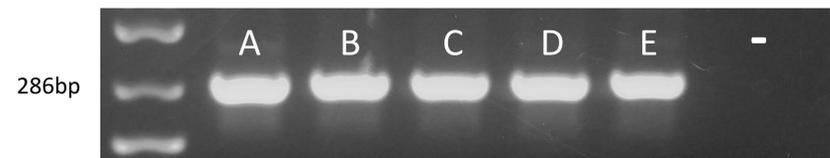


Fig. 1: Visualização em gel de agarose dos fragmentos amplificados por PCR com gradiente de temperatura, (A) 55°C, (B) 58°C, (C) 61°C, (D) 63°C, (E) 65°C e (-) controle negativo.

### 3.4. Sequenciamento

Após o sequenciamento, obteve-se uma seqüência consenso com o tamanho de 286bp, o qual revelou 95% de identidade com HSP70 do peixe Robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Fig.2). O fragmento sequenciado foi depositado no GenBank sob o número de acesso KU639716.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Odontesthes humensis HSP70 mRNA, partial cds</a>	523	523	98%	7e-145	100%	<a href="#">KU639716.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Stegastes partitus heat shock 70 kDa protein 1 (LOC103376405), partial mRNA</a>	453	453	97%	9e-124	96%	<a href="#">XM_008306781.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Oreochromis niloticus heat shock 70 kDa protein 1-like (LOC100694403), partial mRNA</a>	442	442	97%	2e-120	95%	<a href="#">XM_003442456.3</a>
<a href="#">Lutjanus sanguineus heat shock protein 70 mRNA, complete cds</a>	442	442	97%	2e-120	95%	<a href="#">HQ331120.1</a>
<a href="#">Dicentrarchus labrax HSP70 (HSP70) mRNA, complete cds</a>	442	442	97%	2e-120	95%	<a href="#">AY423555.2</a>

Fig. 2: Blast realizado a partir da seqüência consenso da HSP70 de peixe-rei.

### 3.5. Análise da expressão gênica da HSP70

A expressão gênica da HSP70 diminuiu significativamente em peixes-rei submetidos ao glifosato, quando comparada com as amostras controle (Fig.3).

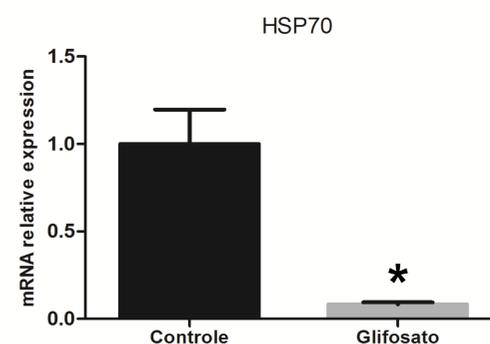


Fig. 3: Expressão relativa do gene da HSP70 em peixes submetidos ao glifosato e controle.

## 4. PERSPECTIVAS

Ampliação do estudo, através da análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, já clonados pelo nosso grupo de pesquisa, visando contribuir no entendimento dos efeitos genotóxicos do glifosato em peixes-rei.

## 5. BIBLIOGRAFIA

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; L. LÓPEZ, S.; E. CARRASCO, A. **Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling.** Chemical Research in Toxicology, Buenos Aires, v. 23, p. 1586–1595, 2010.

NOGUEIRA, L., RODRIGUES, A. C. F., TRÍDICO, C. P., FOSSA, C. E., & ALMEIDA, E. A. **Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil.** Environmental Monitoring and Assessment, São Paulo, v. 180, p. 243–255, 2011.