

# ANÁLISE DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS DE COLOSSOMA MACROPOMUM (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)

Álisson Thiago Barbosa PEREIRA<sup>1</sup>; Eliane Cardoso CARVALHO<sup>2</sup>, Jorge Ivan Rebelo PORTO<sup>3</sup>;  
<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Mestranda-Colaboradora; <sup>3</sup>Orientador CPBA/ INPA

## 1. Introdução

Dentre as espécies de peixes mais capturadas de alto valor comercial na região amazônica, destaca-se o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). É um dos peixes mais apreciados da culinária amazônica e amplamente aceito em outras regiões, devido ao seu excelente sabor, consistência e coloração branca da carne, pouca presença de espinhos e facilidade para obtenção de filés.

Estudos genéticos do tambaqui têm sido conduzidos tanto em exemplares selvagens quanto de pisciculturas, a saber: estudos citogenéticos (Almeida-Toledo et al., 1987), estudos protéicos e enzimáticos (Teixeira & Jamieson, 1985; Almeida-Val et al., 1990; Calcagnoto et al., 1999; Calcagnoto & Toledo-Filho, 2000), além de estudos do DNA como locos microssatélites (Calcagnoto et al., 2001), do íntron 3 do gene do hormônio de crescimento - GH (D'Assunção et al., 2003), e ESTs (Bentes-Sousa, 2009).

Nos últimos anos, os programas de aquicultura têm dado elevada importância às avaliações genéticas, com vistas não somente a ampliar a produção como também em manter a diversidade genética dos estoques (Martins et al., 2002). O conhecimento e a conservação da variabilidade genética mantida nos estoques de peixe são prioridades atuais da piscicultura brasileira (Calcagnoto & Toledo-Filho, 2000). Assim, os conhecimentos sobre marcadores de DNA evoluíram do seu estado experimental e gradativamente estão sendo incorporados à aquicultura de forma prática e eficiente (Martins et al., 2002). A riqueza de informações fornecidas por vários projetos genomas, e os avanços na genômica funcional e tecnologia transgênica, têm adicionado novos recursos do campo da biotecnologia para a aquicultura (Melamed et al., 2002).

A caracterização estrutural dos ribossomos e proteínas ribossomais de peixes tem sido possível através do emprego de sequenciamento de DNA. Os ribossomos catalisam a tradução do RNA mensageiro em proteínas e no caso dos ribossomos eucariotos (80S) são conhecidos 4 tipos de rRNA: 5S; 5.8S e 28S (que fazem parte da subunidade maior - 60S) e o 18S (que constitui a subunidade menor - 40S) e aproximadamente 80 proteínas ribossomais. As proteínas ribossomais das famílias gênicas *rpl* e *rps* agrupam-se no núcleo do RNA e cada proteína reconhece seu sítio de ligação específico e juntos agem na dinâmica da macromolécula. Estudos comparativos de genes codificantes das proteínas ribossomais tem mostrado que mutações comprometem a biogênese ribossômica e síntese protéica (Enerly et al., 2003; Machado et al., 2007).

Este trabalho é um desdobramento de um projeto de sequenciamento nucleotídico de um banco de cDNA da hipófise e cérebro de *Colossoma macropomum* (Bentes Sousa, 2009; Porto et al., 2009), o qual pretende contribuir para o conhecimento estrutural do gene *rps 7* do tambaqui (*Colossoma macropomum*), gene codificante de proteína ribossomal associada à subunidade menor, e realizar uma análise comparativa entre as sequências nucleotídicas presentes entre o *rps 7* de *C. macropomum* com outras espécies de peixes previamente analisadas.

## 2. Material e Métodos

O gene *rps 7* do tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi identificado à partir de um banco de cDNA contruído (Bentes-Sousa, 2009). A sequência nucleotídica codificante deste gene foi comparada com sequências depositadas no banco de dados público do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio do programa BLAST, buscando-se sequências de cDNA e de DNA genômico. Este procedimento foi realizado para determinar se o fragmento sequenciado correspondia ou não ao tamanho total do gene e também para verificar a posição de exons e íntrons do gene *rps 7*.

Uma vez montado um pequeno banco das sequências encontradas procedeu-se ao desenho de *primers* específicos para serem sintetizados quimicamente e utilizados nas diferentes ampliações dos exons e íntrons. Para isso foi utilizado o programa PRIMER 3 (Rozen e

Staletsky, 2000). Os parâmetros físicos utilizados para o desenho dos *primers* foram: número de bases no mínimo de 20, máximo de 25 e ideal de 23 bases,  $T_m$  (*Temperature melting*) foi de no mínimo 60°C, máximo 68°C e ótima de 63°C, máximo de complementaridade na porção 5' de 5 nucleotídeos e na 3' de 2 nucleotídeos e o conteúdo de GC foi no mínimo de 40% e no máximo de 50% da sequência.

Foi extraído o DNA de uma amostra de tambaqui (*Colossoma macropomum*) juvenil, sendo um procedente da Estação de Piscicultura de Balbina. O tecido muscular retirado foi colocado em microtubos contendo etanol 100% e armazenado em um freezer a -80°C, para a futura extração de DNA. O protocolo de extração de DNA utilizado foi o de Sambrook & Russell (2001). A análise da concentração e integridade do DNA extraído foi feita após corrida eletroforética (com tampão Tris-Borato-EDTA 1X e corrida a 70 V por 40 minutos) em gel de agarose 0,8% usando-se 1µL DNA. A visualização e o registro fotográfico do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador Easy Doc (BioAgency). O Gel de agarose foi corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium – Uniscience).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient, para um volume final de 25 µL (100 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 0,5 unidade de Taq Polimerase; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 de cada primer; 2,0 de cloreto de magnésio e água mili-Q para completar o volume). O perfil de reação utilizado foi 35 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após todos os ciclos, uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à corrida eletroforética, em gel de agarose a 1,5%, para a verificação da amplificação da região gênica. Para a visualização das bandas o gel foi corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium – Uniscience) e em seguida fotodocumentado em fotodocumentador Easy Doc.

Na reação de sequenciamento nucleotídico foi utilizado 2 µL de DNA purificado, 1 µL de cada primer, 2,5 µL de tampão Big Dye, 0,3 de Big Dye terminator (cycle sequencing kit da Applied Biosystems). A etapa seguinte incluiu a precipitação das amostras purificadas com a utilização do protocolo de etanol/EDTA finalizando com o sequenciamento das amostras em sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems). Após a leitura das sequências pelo sequenciador, estas foram editadas no programa Bioedit (Hall, 1999) o qual foi possível através da homologia dos sítios entre os indivíduos. Para o alinhamento utilizamos o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) o qual forneceu a base para a construção de uma matriz de dados contendo todas as sequências nucleotídicas.

### 3. Resultados e discussão

Com base na comparação do gene *rps7* de tambaqui, disponível no banco de cDNA de Bentes-Sousa (2009), com outras espécies de peixes, foi possível inferir o posicionamento dos exons e íntrons do gene e desenhar *primers* (Figura 1, Tabela 1). Possivelmente o gene *rps7* do tambaqui deve conter 6 exons e 5 íntrons, porém no banco de cDNA do tambaqui o sexto intron não foi encontrado. De posse deste mapeamento foi possível delinear uma estratégia de desenho de *primers* para tornar eficaz o processo de sequenciamento e caracterização do gene.

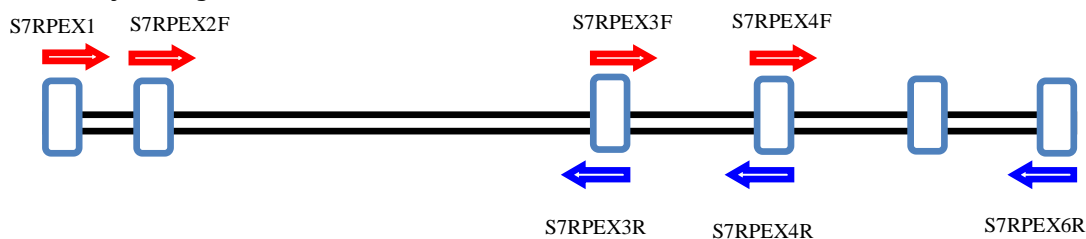


Figura 1. Representação esquemática do gene *rps7* de *Colossoma macropomum* mostrando os exons, íntrons e os sentidos dos *primers*. Os retângulos representam os exons. As duas linhas pretas simbolizam os íntrons. As setas indicam a direção de cada um dos *primers*.

Após a aquisição dos *primers* foram realizados diversos testes de amplificação. A amplificação ocorreu usando as seguintes combinações: S7RPEX1F e S7RPEX3R; S7RPEX2F e S7RPEX3R; S7RPEX2F e S7RPEX4R; S7RPEX3F e S7RPEX4R. Foi observado que S7RPEX1F e S7RPEX2F se sobrepõem assim o anelamento ocorreu no mesmo lugar.

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos *primers* sintetizados e usados na caracterização nucleotídica do gene *rps7* do *Colossoma macropomum*. \* = *Primers* descritos por Chow & Hazama (1998).

Identificação	Exon	Sentido	Bases	Tamanho
S7RPEX1F	Exon1	5´	ATGTTTCAGTACCAGCGCGAAAAT	23bases
S7RPEX2F*	Exon2	5´	AGCGCCAAAATAGTGAAGCC	20bases
S7RPEX3R*	Exon 3	3´	GCCTTCAGGTCAGAGTTCAT	20bases
S7RPEX3F	Exon 3	5´	GAAAGCCATCATCATCTTTGTGC	23bases
S7RPEX4F	Exon 4	5´	AGGAAAAGCCACACAAAGAACAAG	24bases
S7RPEX4R	Exon 4	3´	GACGCTTCTGCTTGTCTTTGTGT	24bases
S7RPEX6R	Exon 6	3´	TCNAATANNACNTCNTTNCCTGT	24bases

Foram obtidas 3 sequências consenso, a primeira relativa a combinação dos *primers* S7RPEX1F e S7RPEX3R; S7RPEX2F e S7RPEX3R, usando os *primers* senso (ATGTTTCAGTACCAGCGCSAAAATMGTGAAGCCAAACGGSGAAARSCRRRAKRRKTTSGRDTYKGGC WTTTCCMSGTAAGACTGTAAA WAAAGTTCATTTTTGCCTTCATAAMTGCAGTACATCCTGGACAT GGAGTGTCTGCTAGGCATACTTTGGTGGCTTTGCTTTCTAACATGTTTGAATCAAACGATCAGTTA CTTAACTAGCCTTACTTGAATTGATTTGGTGCAGAGGAAACATTAATAATGTGTGCGGGCAGGAGTGT CCTGGACCAGGGCTGGAACGACTGCACTGTATAAACGTTGGCATCGGTTCTGTTCAATGTTCTTKKW ACARGSYCTTCTGAGCTGGAGATGAACTCTGACCTGAAGGC).

A segunda relativa a combinação S7RPEX3F e S7RPEX4R usando o *primer* senso (MYVDRAGTYTYCAGAAGATCCAGGTGCGTCTTGTGCGCGAGTTGGAGAAGAAATTTAGCGGCAAG CATGTGGTCTTCATCGCACAGGTAAGGACACCACACCCACATGCCATGCTTTCGACAGCTGTAAT GCTGCGCTGTTGTGTATAAGCCTAAGTGAGGCCAAAGGAGTGACGTGTTTTAATTTAAACATAAGT GGGCTAGTGGTGTGAGCKTATCATTTATATAGAGGGCTTATTTGAACTTAAAGCAAATAAGGAATGT CTTGGCAGAYGATGTAATAAGTYGTATCCAGAAATGTTGTGTAAGTGGTCAGACTTCAGCATTGAG CCCATTTCTTCTTGTGCCATCTTAATGAAGTGGAGTTTTTTTTWTTGKKGADMYTTWTTTTTAAAMMM ATGKGSYWACCTCCCTYCYGGAWRTGKARAAYAMCYSTGSCCCACAWWRTRKARAWSKCYTCYMT CCTCACRRGKKKTGKGGKGBCMCMRSSTRYACMCCACMCMGTGWWRAGCGYAWMMGMWMYMCT AWKWRAACTGAGAMMSDWWAGWTTTCYGCYGRKTGRRAWWTWAACYKYRCTCYMMCMASDCT YCTTTWAGRKRWGAWRRWGAASAMYSTGKWGAWTTYCCYSBGCTYCMAGWKKARMVACWTMWA GARATAWATCYMARGSSCCATACTSKRRWKTRGMHHWGTGGTGKKDKARWATGGRGAGCASTCT CRACASRYBSYAKGSMRTGKWBCTACASRASSACTGRMMMTGYMKRTRCAYWYDBKSCYWWW RTMRMATCTCTCTCTCTTATAAATATAG).

A terceira relativa a combinação S7RPEX3F e S7RPEX4R usando o *primer* anti-senso (TAGAGTAGTGGAGAGMRTCKCAGCAYRCRYRGRCAGTGKTAASAGSMCCASWYGTGAGAMMC AKTSGCATAKYGCWTTTTTCTCTWTWATAARTGGTTTGTAGRCKTWTMTGARTTTAYWSTRYW GTGTRAAGCSYGGKTTTGTAKWGAKATAKCAAAAWGGSTAKTRYWGTRGMGTTAAGGKKATYTTTT ACRYGARCAITWMTTYCYMYTAAAGAGGAGMKATCTGTGTGGTTAAAAAAGYGCATRTRAGRTGW MWRAGTRTAWWTWATYSTCSTKCTMCAWSTCAKYTCYGTWTKWGTCGWWRGGKGTYYYYCTYM TCRAGKAGCGKYGCWMYACYTKGWAWATWAYACRAGAYTWKASACAATGKWGARTGWSTGYACA TAMCCAACGTGGGCRCCYGTGAGAKGGSTCTCWYATGGSTCTGTSYSTGTGGSGTRTGGGRMGT RGCRCAYTAGWGYCAYGASGTRTGGTSCCYTTYACGASGYKGRKAGCRYGCAYGTSYCCSGSTCTT GSKGKTAGGGRSGSGTCCYGTATATTCYAGGTCTTCCCMSAGMTCTTTTGGSTATWWYWG GGG RGRATAAMCAYRCASWGCACAYGAKWTAARATTTTTYTAAGATGATAWGGTTTTAAAAACTGCAAGA TGTTAATTCAGAGTCTTTATGCAGAGGAGAATCCTGCCAAGCCMMAAAA).

Com base na análise comparativa das espécies *Danio rerio* (paulistinha = zebrafish) e *Ictalurus punctatus* (bagre de canal), esperava-se que o gene contivesse algo em torno de 3.903 e 4.801 nucleotídeos. Neste trabalho conseguimos sequenciar segmentos nucleotídicos contendo o Exon 1, o Intron 1, parte do Exon 2, o Exon 3 e parte do Exon 4. **Totalizando em torno de 1.200 nucleotídeos.**

#### 4. Conclusão

As regiões codificantes (Exon) do gene *rps7* de tambaqui mostraram similares a outras espécies de peixes. As regiões não codificantes (Intron) apresentaram-se muito dissimilares não permitindo o alinhamento nucleotídico com outras espécies de peixes.

#### 5. Referências

Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A; Bernardino, G.; Ferrari, W.; Alcantara, R.C.G. 1987. Cytogenetic studies on *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their interspecific

hybrid. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture*: 189-195.

Almeida-val, V.M.F.; Schwantes, M.L. & Val A.L. 1990. LDH isozymes in Amazon fish. I. Eletrophoretic studies on two species from Serrasalmidae family: *Mylossoma duriventris* e *Colossoma macropomum*. *Comp. Biochem Physiol.*, 95B: 77-84.

Bentes-Sousa, A.R. 2009. *Análise do transcrito de etiquetas de seqüências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (Colossoma macropomum) e expressão do cDNA do hormônio de crescimento em Pichia pastoris*. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.

Calcagnotto, D., Russello, M. & DeSalle, R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalmidae fish. *Molecular Ecology Notes*, 1 (4): 245-247.

Calcagnotto, D.; Almeida-Toledo L. F.; Bernardino, G.; Almeida Toledo-Filho, S. 1999. Biochemical genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu / *Piaractus mesopotamicus* and tambaqui / *Colossoma macropomum* reared in Brazil. *Aquaculture*, 174: 51-57.

Calcagnotto, D.; Toledo-Filho, S.A. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Biology*, 23 (1): 127-130.

Chow S. & Hazama K. (1998) Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology*, 7, 1247-1263.

D'Assunção, A. A. A.; Santos, M.C.F., Farias, I. P. e Porto, J.I.R. 2003. Estimativa Preliminar da Variabilidade genética do tambaqui (*Colossoma macropomum*) pelo seqüenciamento do hormônio de crescimento (GH). 4o Encontro de Genética do Amazonas/ 1º Encontro de genética da Região Norte, Manaus-Am, p. 108.

Enerly, E.; Ahmadi, H.; Shalchian-Tabrizi, K.; Lambertsson, A. 2003. Identification and comparative analysis of the RpL14 gene from *Takifugu rubripes*. *Hereditas*, 139: 143-150.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41:95-98.

Manchado, M.; Infante, C.; Asensio, E.; Cañavate, J.P.; Douglas, S.E. 2007. Comparative sequence analysis of the complete set of 40S ribosomal proteins in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) (Teleostei: Pleuronectiformes): phylogeny and tissue- and development-specific expression. *BMC Evolutionary Biology*, 7:107-119.

Martins, C.; Porto-Foresti, F.; Wasko, A. P.; Leitão, G. R.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2002. Marcadores Genéticos na piscicultura. *Biotechnology & Desenvolvimento*. 28: 12-15pp.

Melamed, P.; Gong, Z.; Fletcher, Hew, C.L. 2002. The potencial impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204:255-369.

Porto, J.I.R.; Bentes-Sousa, A.R.; Astolfi-Filho, S. 2009. Caracterização de genes codificantes de proteínas ribossomais do tambaqui (*Colossoma macropomum*) por análise transcriptômica de ESTs (Expressed Sequence Tags). *Resumos do 3º. Encontro de Genética do Norte, CD-ROM*.

Rozem, S.; Skaletsky, H. J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: KRAWTZ, S.; MISENER, S. (Ed.). *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Ottawa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.