

**CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DO PROMOTOR DO GENE DO
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES DE
INTERESSE PARA PISCICULTURA (*Colossoma macropomum*-TAMBAQUI E
Piaractus mesopotamicus-PACU): ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE
MICROSSATÉLITES NA REGIÃO 5' PROXIMAL**

**Suhaila Karim Khalil Jaser¹; Léia Cecilia Lima Fávaro²; Alexandre Wagner Silva
Hilsdorf³**

Estudante do Curso de Biologia; e-mail: suhaila.16@hotmail.com¹

Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroenergia –
Brasília - Distrito Federal; e-mail: leiafavaro@gmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br³

Área do Conhecimento: Genética Animal

Palavras-chave: Aquicultura tropical; Sequenciamento; TAIL-PCR

INTRODUÇÃO

Colossoma macropomum (tambaqui) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu) são peixes de água doce da América do Sul de grande importância para aqüicultura neotropical, onde *P. mesopotamicus* é a quarta espécie de maior produtividade na aqüicultura brasileira, muito visado para a comercialização e exportação e *C. macropomum* pode chegar a pesar até 30 Kg em seu habitat natural (PINHEIRO *et al.*, 2008; SOUZA, 2009). Em todos os vertebrados o hormônio responsável pela estimulação do crescimento é o GH, secretado pela glândula hipófise. É comprovado que em muitas espécies de peixes o aumento dos níveis de GH contribui para um maior crescimento (ALMULY *et al.*, 2005). Vários fatores presentes neste gene são capazes de controlar sua transcrição, tais como, fatores de transcrição específicos da glândula pituitária e complexos formados por outros hormônios associados ao crescimento e seus receptores, ambos ligam-se a elementos de resposta localizados na região promotora do gene GH (TRUDEAU, 1997). Trabalhos anteriores com diferentes organismos mostram que microssatélites, sequências repetidas em tandem as quais são abundantemente distribuídas nos genomas e apresentam altos níveis de polimorfismo, localizados na região promotora dos genes também podem modular o nível de expressão gênica (CHISTIYAKOV *et al.*, 2006). O trabalho realizado por ALMULY e colaboradores (2005) com *Sparus aurata* demonstrou que microssatélites na região promotora do gene GH podem ser candidatos a marcadores genéticos para programas de seleção, visando crescimento desta espécie. Visto que em trabalhos anteriores microssatélites foram encontrados na região 5' proximal do gene GH e foi constatado que são capazes de influenciar sua expressão e alterar as taxas de crescimento de peixes, faz-se necessário o estudo deste fenômeno em espécies importantes para a aqüicultura neotropical, como *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos a caracterização da região 5' proximal do gene GH de *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum* e a investigação da possível presença de sequências microssatélite nesta região.

METODOLOGIA

Uma porção do tecido da nadadeira caudal de exemplares de *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* foi obtida para a extração do DNA genômico que foi utilizado para a amplificação do primeiro *Intron* do gene GH, realizada com *Primers* desenhados no presente trabalho com base no cDNA das duas espécies. O primeiro *Intron* foi clonado em células de *Escherichia coli* DH 5a, sequenciado com os *Primers* universais M 13 *Foward* e *Reverse* e a sequência obtida foi ligada ao cDNA, logo após a última base do primeiro *Exon* para que fosse possível o desenho de *Primers* altamente específicos, utilizados na amplificação da região 5' proximal do gene através da técnica de TAIL-PCR (LIU *et al.*, 1995). Os fragmentos amplificados foram clonados em células de *Escherichia coli* DH 5a para que fossem sequenciados com os *Primers* universais M 13 *Foward* e *Reverse* e com as sequências obtidas uma sequência consenso foi montada com o auxílio dos programas MEGA v.4 e Codon Code Aligner. Esta sequência foi comparada com sequências promotoras do gene GH de outras espécies de peixes, como *Sparus aurata* (AY138985.2), *Pangasianodon hypophthalmus* (HM137287.1), *Cyprinus carpio* (X51969.1) e Salmão (L04688.1), obtidas no Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para a certificação de que o fragmento amplificado pela técnica de TAIL-PCR realmente se tratava da região promotora e para a identificação de sítios conservados existentes na região. A região 5' proximal do gene GH de *P. mesopotamicus* foi alinhada a promotores do gene GH de outras espécies de peixes, para a verificação da possível existência de sequências microssatélite, seguindo o trabalho de ALMULY *et al.* (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise do sequenciamento do fragmento amplificado pela técnica de TAIL-PCR uma sequência consenso foi obtida e verificou-se que realmente se tratava da região promotora do gene GH de *Piaractus mesopotamicus*, como era esperado, pois a região inicial do cDNA desta espécie foi identificada se anelando às últimas bases da sequência consenso obtida (**Figura 1**), confirmando a eficiência da TAIL-PCR.

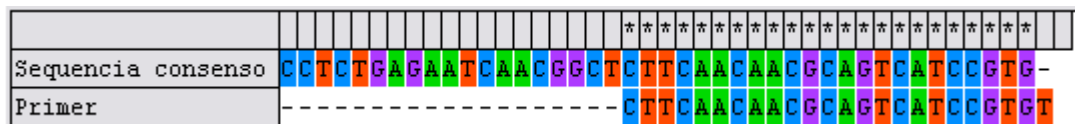


Figura 1: Alinhamento da sequência consenso com a região inicial do cDNA de *P. mesopotamicus*, realizado no programa MEGA v.4.

Fazendo a comparação da região 5' proximal do promotor gene GH, caracterizada no presente estudo, com espécies que apresentam microssatélites nesta região verificou-se a ausência destas sequencias em *P. mesopotamicus*, diferentemente do que foi verificado em *Sparus aurata* no trabalho de ALMULY *et al.* (2005) porém, similar ao que ocorre com *Pangasianodon hypophthalmus*, *Cyprinus carpio* e Salmão, como pode ser visto na **Figura 2**.

```

>PM: TCAATAAAATCTCCAAGAGTTTCACTCTTTATACTGCATATTTCTGTACACAGTCTGCCCATGTTTAGTCCCAATTAACCTCAAATTAG
CATTTTACTTTAACTTTTATCTCTATAAAACTGGAGTAAATGACCAATGAAGAATCTTTAATGATTCCAGTCCAAAGACAGTGTATGTATGTT
AAAGATGCTTTTACATTTTAAAGGATTGGTTCTGCTCTCCGTTGTGGTGGCAAGTGTGTTGTTAGCCAGGGCTCAACCTT

>PH: ACGTATACCAATTAATAACTATTCAAAAAAATTCATAGAAATCAGCCTGGATGTTATTGCGGAAGGTGTGAGGTTTCTCATGTTGA
TGCATTAAACATGCTTACTTCCCTATAAAATCAGGCCAGCACTCCAAGAGGA

>CC: GTTCGTATGGTGTCTAAATACACGCAGCAATGCATATCAACATAGTTCTCATGGAACTCTCATGTTTCAACTCTCATGCATTAAGA
TGCATTAAAACATGTTTCATGCCACAATAAAATATCAGTACCTGAGCCTGAAAAA

>SM: ATACTGATAGTTCATAGTCACATACAAAAACAGGTCCCATCGGCGAGAGGTGGTACATGGAGAACATCTCATGCGTCTCTCTGTTGAT
ACATTAAAACATGTTGTTCCCATCTATAAAAACAGTGGCCCCGAACAAGCGGCA

>SA: TTATTATTGAGGTATTTCATGTTAAACACACACACACACACACACACACACACACCTCGGTAGTTGTTTGGTTTTCATGTTTCTGTTGATG
AATTAATTCATCAAGTTTCTGCTATAAAACCACAAAAGTCTGAGCTGAAATA

```

Figura 2: Comparação da região 5' proximal do gene do Hormônio de Crescimento de *Piaractus mesopotamicus* (PM) com a mesma região de *Pangasianodon hypophthalmus* (PH), *Cyprinus carpio* (CC), Salmão (SM) e *Sparus aurata* (AS). Em verde esta marcada a região do TATA Box, em amarelo o microssatélite presente em *Sparus aurata* e em cinza a primeira base do peptídeo maduro.

CONCLUSÕES

A técnica de TAIL-PCR foi eficiente na amplificação da região 5' proximal do gene de Hormônio de Crescimento de *Piaractus mesopotamicus*. A espécie estudada neste trabalho não apresentou sequencias microssatélites na região 5' proximal do gene GH. Foi obtida a sequência completa do primeiro *Íntron* do gene do Hormônio de Crescimento de *Piaractus mesopotamicus*, região considerada importante para estudos de polimorfismo (NADJAR-BOGER & FUNKENSTEIN, 2011 e BLANCK *et al.*, 2009). A amplificação da região promotora do gene GH ainda não foi possível para *Colossoma macropomum*, portanto o mesmo trabalho será realizado com esta espécie em uma próxima etapa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMULY, R.; POLEG-DANIN, Y.; GORSHKOV, G.; RAPOPORT, B.; SOLLER, M.; KASHI, Y.; FUNKENSTEIN, B. Characterization of the 5' flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. **Fisheries Science**, 71, 1, 479-490. 2005.
- BLANCK, D. V.; GASPARINO, E.; RIBEIRO, R. P.; MARQUES, D. S. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia-do-Nilo. **Pesq. Agropec. bras.**, 44, 6, 599-604. 2009.
- CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, 255, 1, 1–29. 2006.
- LIU, Y. G.; MITSUKAWA, N.; OOSUMI, T.; WHITTIER R. F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **Plant Journal**, 8, 1, 457–463. 1995.
- NADJAR-BOJER, E.; FUNKENSTEIN, B. Myostatin-2 gene structure and polymorphism of the promoter and first intron in the marine fish *Sparus aurata*: evidence for DNA duplications and/or translocations. **BMC Genetics**, 12, 22. 2011.

PINHEIRO, J. S.; WOLFF, J. L. C.; ARAÚJO, R. C.; HILSDORF A. W. S. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of Neotropical freshwater fish Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1, 381-384. 2008.

TRUDEAU, V. L. Neuroendocrine regulation of gonadotropin II release and gonadal growth in the goldfish *Carassius auratus*. **Reviews of Reproduction**, 2, 1, 55-68. 1997.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa – UMC.