

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO DE *Colossoma macropomum*: 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: leiafavarol@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) é um peixe de água doce da América do Sul de grande importância para a aquicultura neotropical e pode atingir 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 o 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 aquicultura neotropical, como *C. macropomum*.

OBJETIVOS

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

METODOLOGIA

Uma porção do tecido da nadadeira caudal de um exemplar de *C. macropomum* foi obtida para a extração do DNA genômico que foi utilizado para a amplificação do primeiro *Intron* do gene GH, realizada com iniciadores desenhados no presente trabalho com base no cDNA da espécie. O primeiro *Intron* foi clonado em células de *Escherichia coli* DH 5 α , sequenciado com os iniciadores universais M 13 *Forward* e *Reverse* e a

sequência obtida foi ligada à sequência do cDNA, logo após a última base do primeiro *Exon*, para que fosse possível o desenho de iniciadores 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 5α para que fossem sequenciados com os iniciadores universais M 13 *Forward* e *Reverse* e com as sequências obtidas uma sequência consenso foi montada com o auxílio dos programas MEGA v.5 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 *C. macropomum* 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 dos fragmentos amplificados pela técnica de TAIL-PCR (**Figura 1**) uma sequência consenso foi obtida e verificou-se que esta não apresentou similaridade com a região promotora do gene GH de outras espécies de peixes, nem mesmo foi possível alinhá-la ao início do primeiro *Exon* onde os iniciadores específicos para a sua amplificação foram desenhados. Com isso, se faz necessário a construção de novos iniciadores específicos para uma nova tentativa de amplificação desta região.

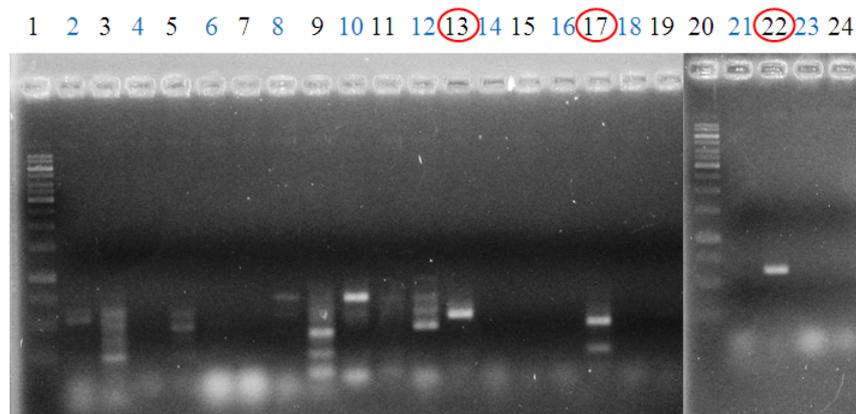


Figura 1: Eletroforese horizontal dos produtos da TAIL-PCR. Combinação entre o **conjunto 2 de iniciadores específicos** e os onze iniciadores degenerados. Canaletas 1 e 20: marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas). As amostras destacadas em azul correspondem às reações secundárias e em preto suas respectivas reações terciárias. As amostras que apresentaram os amplicons esperados estão circuladas em vermelho.

CONCLUSÕES

Um novo conjunto de iniciadores específicos será gerado para uma nova tentativa de amplificação da região promotora do gene GH de *C. macropomum* utilizando-se a técnica de TAIL-PCR, já que esta se mostrou eficiente para *Piaractus mesopotamicus*.

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.

CHISTIAKOV, 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 e à Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa pelo apoio.