



Panorama da AQUICULTURA



25 Anos

CAMANOR SE REINVENTA E LUCRA MESMO COM O VÍRUS DA MANCHA BRANCA



A aquicultura e os nossos filhos • A transgenia na piscicultura: realidade ou ficção? • Novo Decreto estabelece as regras para a aquicultura no Estado de São Paulo • Opinião: licenciamento ambiental da aquicultura de São Paulo • CAUNESP presta mais uma homenagem ao mestre Newton Castagnolli • 10ª AquaVision 2014: evento reúne 400 líderes do setor • Decifrado genoma completo do salmão do Atlântico • Entrevista com o engenheiro de pesca José Nailton Canuto

A transgenia na piscicultura: realidade ou ficção?

Nas últimas décadas, os avanços biotecnológicos têm disponibilizado uma série de ferramentas que possibilitam isolar e transferir genes de uma espécie para outra. Nesse contexto, a transferência gênica (transgênese) surgiu como uma alternativa promissora para aumentar a produção aquícola. Diferentemente dos métodos convencionais de melhoramento genético aplicado à piscicultura, os quais foram descritos nos artigos anteriores desta série, a transgênese produz resultados mais imediatos sem a necessidade de usar um grande número de animais, bem como encurtando o tempo de obtenção de genótipos favoráveis geralmente obtidos em programas de melhoramento por seleção. Mas, afinal, o que é um peixe transgênico? Como um organismo transgênico é produzido? Quais as aplicações da transgenia na aquicultura? Já há peixes transgênicos sendo comercializados? Quais os riscos dessa tecnologia? E no Brasil, já temos algum peixe transgênico? Nesse artigo pretendemos esclarecer o leitor tais questões e desmitificar a técnica de transgenia.

Por:

Dr. Carlos Frederico Cecon Lanes
fredcecon@yahoo.com.br
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Laboratório de Biologia Molecular

Dra. Daniela Volcan Almeida
danivolcan@yahoo.com.br
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Laboratório de Biologia Molecular

Dr. Márcio de Azevedo Figueiredo
mfigueiredo@furg.br
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Laboratório de Biologia Molecular

Prof. Dr. Luis Fernando Marins
dqm@furg.br
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Laboratório de Biologia Molecular

Prof. Dr. Alexandre W.S. Hilsdorf
wagner@umc.br
Universidade de Mogi das Cruzes
Laboratório de Genética de Organismos
Aquáticos e Aquicultura



Por definição, organismos transgênicos são aqueles que tiveram a inserção de um ou mais genes em seu genoma (sequência completa de DNA de um organismo) por meio das técnicas de engenharia genética. O gene inserido pode ser endógeno (já existente no genoma do animal) ou exógeno (genes provenientes de outras espécies). O primeiro registro da produção de peixes transgênicos foi reportado em 1985, quando o gene do hormônio do crescimento (GH) humano foi microinjetado em ovos recém-fertilizados de goldfish (*Carassius auratus*). No entanto, essa tecnologia ficou realmente conhecida a partir de um artigo publicado na revista Nature em 1994 por pesquisadores canadenses, mostrando-se de grande potencial para a indústria aquícola.

Nesta pesquisa, intitulada “Extraordinary salmon growth” (Crescimento extraordinário do salmão), salmões transgênicos para o GH apresentaram um crescimento até 37 vezes maior do que os seus irmãos não transgênicos. A partir desse estudo, uma série de espécies de peixes tornou-se alvo de manipulação genética com os mais diferentes objetivos. Até o momento, aproximadamente 50 espécies de peixes já foram modificadas geneticamente, resultando em mais de 400 combinações (espécie x característica desejada). A maioria das espécies transgênicas produzidas são aquelas mais usadas na piscicultura, como salmão, truta, tilápia e carpa comum. Entretanto, nenhuma delas ainda está liberada para o consumo humano.

Como produzir peixes transgênicos

Para a produção de um animal transgênico, o DNA exógeno que será transferido para o organismo receptor deve simular a estrutura de um gene normal para ser funcional. Assim o DNA exógeno, também conhecido como transgene ou vetor de expressão, deve ser composto por três partes: (i) a região promotora - dirige a expressão do gene de interesse; (ii) região codificante ou gene de interesse - codifica para a proteína responsável pela característica fenotípica alvo da manipulação; e (iii) região de terminação - contém sinais que indicam a finalização do processo de transcrição.

Para construir um transgene, o primeiro passo é decidir qual a característica de interesse que se deseja introduzir em um determinado organismo. Após isso, identifica-se o gene ou os genes responsáveis por essa característica com a utilização de metodologias de engenharia genética. O gene de interesse pode ser isolado do próprio organismo a ser manipulado, ou de outra espécie caso o organismo alvo não apresente o gene de interesse. Posteriormente, o gene de interesse isolado é incluído num vetor de expressão. Na Figura 1, ilustramos como é possível produzir peixes transgênicos fluorescentes a partir de um gene encontrado no genoma de uma medusa, o qual codifica para uma proteína capaz de emitir fluorescência quando excitada por luz ultravioleta. A mesma estratégia é

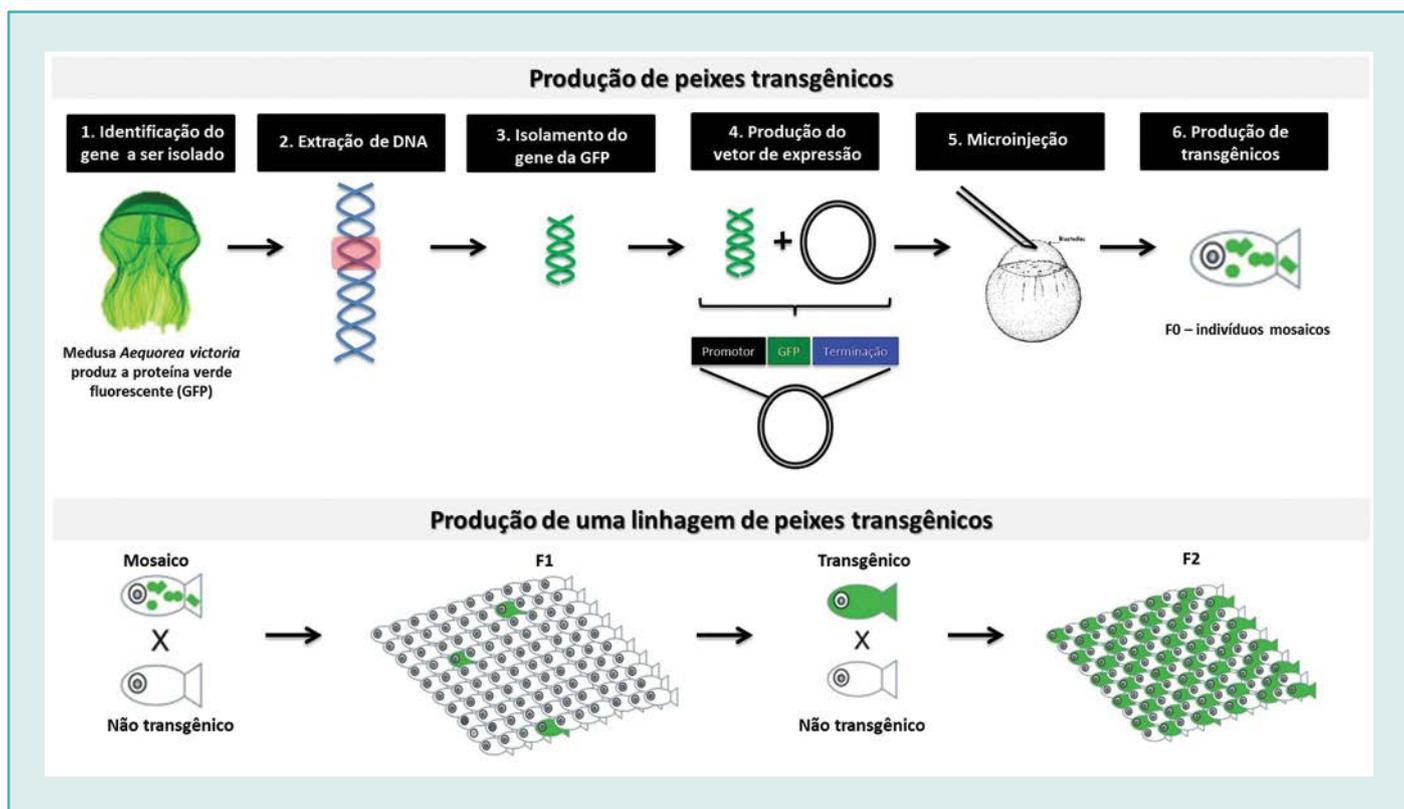


Figura 1: Etapas da produção de peixes transgênicos utilizando a técnica de microinjeção e os cruzamentos para obtenção de uma linhagem transgênica. (Modificado de Udvadia & Linney, 2003)



Figura 2: Processo de microinjeção, na figura pode-se observar o ovócito de mamífero imobilizado por uma micropipeta, sendo penetrado por uma micro-agulha pela qual se injeta o transgene (<http://www.oulu.fi/biocenter/tg-core>)

utilizada para a produção de peixes transgênicos com quaisquer outras características desejáveis.

Em peixes, vários métodos têm sido aplicados para transferir o vetor de expressão para o genoma da espécie hospedeira. Atualmente, as técnicas mais usadas são: microinjeção no citoplasma de ovos recém-fertilizados (1-4 células), infecção por retrovírus, eletroporação, biobalística, lipofecção e a transferência mediada por espermatozoides. Dentre essas, a microinjeção (Figura 2) é a técnica que tem

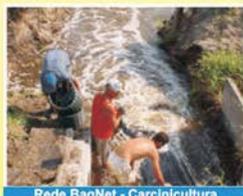
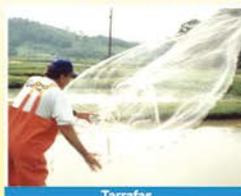
"A produção de peixes ornamentais fluorescentes encontra-se no estágio mais avançado, pois os animais já saíram da etapa de pesquisa e estão sendo comercializados internacionalmente em lojas de aquarismo."



Redes Especiais

Com responsabilidade técnica. Registro no CREA - SC 032233-4

Tecnologia ao seu alcance



LINHA DIRETA :
(47) 3344-6929 * 3344-6997 * 3344-0101
Rua Brusque 460 - CEP 88303-000 - Itajaí - SC

28 ANOS DE DEDICAÇÃO À AQUICULTURA

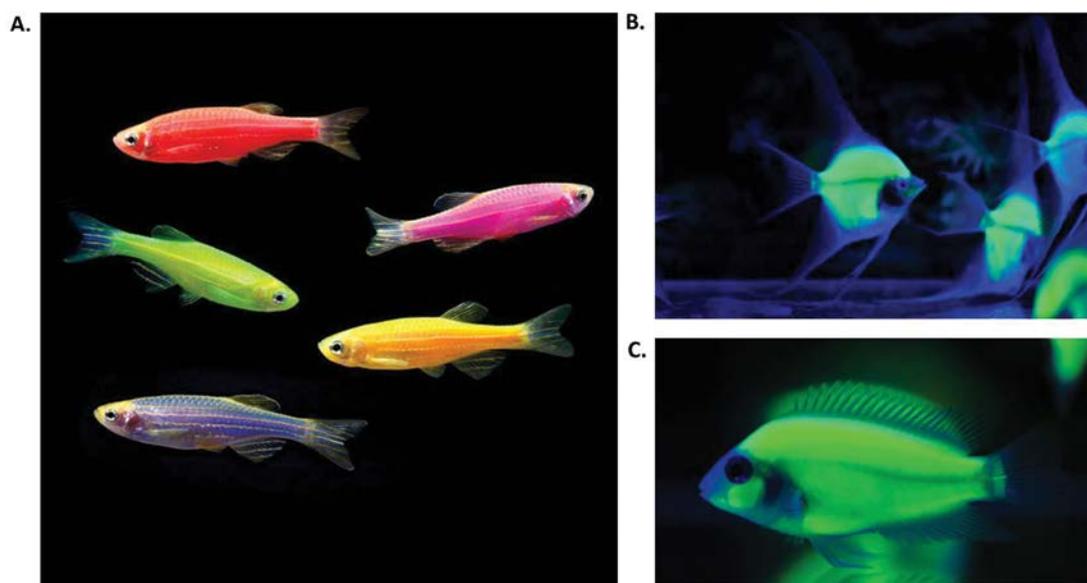
ENGE PESCA LTDA
www.engepesca.com.br

Figura 3: Peixes ornamentais transgênicos expressando diferentes proteínas fluorescentes.

(A) *Danio rerio* (GloFish®, Fonte: www.glofish.com);

(B) *Pterophyllum scalar* (Fonte: Jy Lin Co., Ltd);

(C) *Amatitlania nigrofasciata* (Fonte: Jy Lin Co., Ltd)



sido empregada com mais sucesso em peixes devido à sua simplicidade e confiabilidade. A eficiência na produção de animais transgênicos utilizando essa técnica varia de 5 a 70% dependendo da espécie escolhida, das características do transgene e da habilidade do técnico no processo de microinjeção. A principal desvantagem dessa técnica é a grande probabilidade da produção de indivíduos mosaicos, ou seja, aqueles cujos embriões possuem apenas uma parte de suas células ou tecidos expressando o transgene (Figura 1). Esse fenômeno aumenta o esforço necessário para a identificação de transgênicos com potencial para gerar linhagens germinativas. Além disso, é uma técnica muito trabalhosa. Por exemplo, somente cerca de 100 ovos de *zebrafish* (*Danio rerio*) são microinjetados durante uma hora, enquanto para o salmão, somente 30 embriões são microinjetados durante esse mesmo período.

Aplicações da transgenia na aquicultura e a comercialização de peixes transgênicos

Na aquicultura, além da obtenção de peixes com maiores taxas de crescimento, a transgenia também tem sido usada para: (i) aumentar a resistência ao congelamento, (ii) alterar o metabolismo das espécies carnívoras para reduzir a dieta alimentar à base de proteína animal, (iii) produzir peixes estéreis, (iv) aumentar a resistência a doenças, (v) produzir peixes ornamentais fluorescentes e (vi) usar peixes transgênicos como biofábricas para a produção de fármacos. Dentre esses, a produção de peixes ornamentais fluorescentes encontra-se no estágio mais avançado, pois os animais saíram da etapa de pesquisa e já estão sendo comercializados internacionalmente em lojas de aquarismo.

Em 2003, um grupo de pesquisa da Universidade Nacional de Singapura liderado pelo Dr. Zhiyuan Gong desenvolveu diferentes linhagens do *zebrafish*. O "GloFish" (www.glofish.com), como são conhecidos, são considerados os primeiros organismos transgênicos bem sucedidos comercialmente, e são de propriedade internacional da empresa Yorktown Technologies (Texas, EUA). As diferentes linhagens do GloFish® expressam proteínas fluorescentes amarela, vermelha, azul, púrpura e verde. Esses peixes foram produzidos a partir de transgenes constituídos de genes deliberadamente alterados para que as proteínas fluorescentes resultantes emitam fluorescência em diferentes comprimentos de onda do espectro luminoso. A expressão dessas proteínas é controlada por um forte promotor que atua no tecido muscular e a fluorescência é observada quando os peixes são iluminados com lâmpada ultravioleta (Figura 3A). Mais recentemente, em 2010, um grupo de cientistas de Taiwan (Universidade de Sinica) anunciaram a produção e comercialização de outras espécies de peixes ornamentais fluorescentes, os ciclídeos *Pterophyllum scalare* e *Amatitlania nigrofasciata* (Figuras 3B e C). Estes animais surgem como alternativa para o incremento da cadeia produtiva de peixes ornamentais

Além da utilização da transgenia na aquariofilia, a introdução do gene do hormônio do crescimento (GH) em peixes de interesse comercial também tem obtido grande êxito em nível experimental. Na maioria dos casos, os peixes transgênicos para o GH atingem o dobro do tamanho corporal na metade do tempo em que os não transgênicos e, além disso, apresentam uma melhor conversão alimentar. Devido a esse sucesso, a empresa de biotecnologia Aquabounty Technologies localizada em Waltham, Massachusetts (EUA), investiu no desenvolvimento de uma variedade de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) transgênico para o gene do GH isolado do

salmão chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). A variedade transgênica foi denominada de AquAdvantage® (Figura 4). Nos salmões não transgênicos, a produção do GH diminui durante os meses de inverno e, conseqüentemente, os peixes desaceleram sua taxa de crescimento. Para contornar esse problema, a empresa Aquabounty usou um promotor de um gene de uma proteína anticongelante derivado de uma enguia (*Zoarces americanus*), permitindo que o gene GH do salmão chinook fosse expresso durante os meses de inverno. Desta forma, o salmão transgênico consegue crescer satisfatoriamente durante todas as estações do ano, e atinge o tamanho comercial em 18 meses ao invés dos três anos como é o caso dos salmões não transgênicos. É importante salientar que, apesar de atingir o tamanho comercial mais rápido, o salmão transgênico para o GH não alcança um tamanho maior que os salmões selvagens.

Com o desenvolvimento dessa variedade de salmão transgênico, em 1995, a empresa Aquabounty entrou com um pedido de autorização para sua comercialização junto a agência de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos da América (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*). Após 19 anos de intensas pesquisas e debates, a FDA ainda não autorizou a comercialização do salmão transgênico para consumo humano. Contudo, em 2010 a FDA anunciou que o salmão transgênico é um alimento tão seguro quanto o salmão selvagem. Posteriormente, em 2012, a FDA reportou que o salmão transgênico não oferece perigo ao meio ambiente. Ao final de 2013, a empresa Aquabounty recebeu autorização do governo canadense para a produção de ovos de salmões transgênicos e sua comercialização. Todos esses fatos levam a crer que dentro de um curto período de tempo o salmão transgênico para o GH será o primeiro animal liberado para o consumo humano no mundo. Isso demonstra que a transgenia será em breve uma realidade para os produtos advindos da piscicultura.

É claro que com a perspectiva da liberação de um organismo transgênico para o consumo humano, as questões ambientais e os riscos associados à saúde humana têm sido alvos de intensos debates. Para evitar os riscos ambientais relacionados ao escape dos animais transgênicos, a Aquabounty garante que todos os salmões modificados geneticamente serão estéreis (triploides) e fêmeas. Essas medidas biológicas garantem que num eventual escape para o meio ambiente, o salmão transgênico não será capaz de reproduzir com as populações selvagens. Além disso, a Aquabounty propõe separar geograficamente a produção de ovos da fase de crescimento e engorda, possibilitando um

"Fatos levam a crer que dentro de um curto período de tempo o salmão transgênico para o GH será o primeiro animal liberado para o consumo humano no mundo. Isso demonstra que a transgenia será em breve uma realidade para os produtos advindos da piscicultura."

isolamento físico de ambas as fases de criação como medida de prevenção para efetivamente não permitir escape de salmão transgênico para o meio ambiente. Com relação aos riscos à saúde humana, a principal preocupação da FDA está relacionada ao potencial alergênico do salmão transgênico. Até o momento, os estudos realizados não foram conclusivos para indicar se o salmão transgênico para o GH é mais alergênico do que o salmão selvagem. Assim, a FDA recomendou novas pesquisas para a obtenção de dados mais confiáveis.



Figura 4: Salmão (*Salmo salar*) não transgênico (primeiro plano) e o salmão transgênico para o GH denominado AquAdvantage® (segundo plano) com a mesma idade. (Fonte: Aquabounty Technologies)

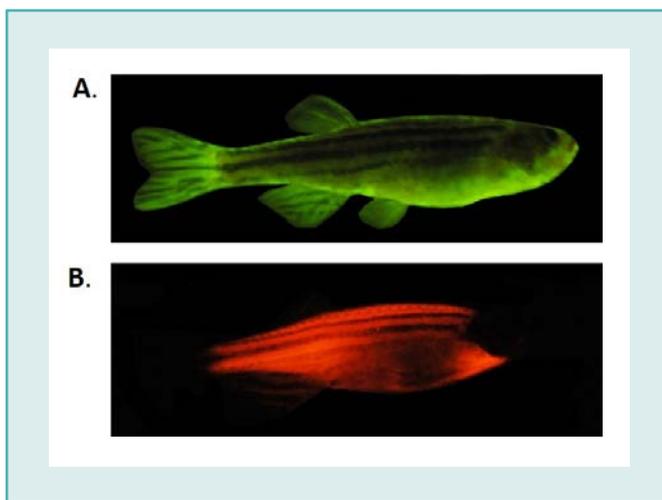


Figura 5: Zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos produzidos no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). (A) Zebrafish transgênico para o gene do GH do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* e para o gene da proteína verde fluorescente (GFP) da medusa *Aequorea victoria*. (B) Zebrafish transgênico para o gene do receptor do hormônio do crescimento do próprio zebrafish e para a proteína vermelha fluorescente de uma espécie de coral marinho, *Discosoma sp.*

Manipulação genética de peixes no Brasil

Até o presente momento, apenas duas espécies de peixes foram manipuladas geneticamente no Brasil:

o zebrafish e o jundiá (*Rhamdia quelen*). A primeira linhagem de peixe transgênico no Brasil foi desenvolvida em 2004 no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Com o objetivo de estudar os efeitos causados pelo excesso de GH, uma linhagem de zebrafish transgênico para o gene do GH do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* foi produzida. Além disso, o gene da proteína verde fluorescente (GFP) da medusa *Aequorea victoria*, também, foi transferido para facilitar a identificação dos animais transgênicos (Figura 5A). Os estudos realizados com essa linhagem comprovam que o excesso de GH tem um efeito positivo sobre o crescimento (Figura 6). Entretanto, as pesquisas realizadas nas áreas de reprodução, tolerância a fatores ambientais e imunidade tem demonstrado que a viabilidade dos animais transgênicos é menor do que os irmãos não transgênicos. Para diminuir os efeitos negativos do excesso de GH, outra linhagem de zebrafish transgênica foi produzida em 2010. A nova linhagem superexpressa o gene do receptor do hormônio do crescimento do próprio zebrafish e a proteína vermelha fluorescente de uma espécie de coral (*Discosoma sp.*) usada para a identificação dos transgênicos (Figura 5B). Entretanto, essa linhagem transgênica apresenta um potencial de crescimento menor do que a linhagem transgênica para o GH.

INOVAÇÃO É O QUE DISTINGUE UM LÍDER DE UM SEGUIDOR.

—Steve Jobs

Como você se mantém à frente em um mar de mudanças?

Espécies aquáticas recém-criadas, mudança na disponibilidade de matérias-primas, e até mesmo controvérsias em questões ecológicas, criaram sérias necessidades de avanços no processamento da alimentação aquática. Como um líder de longa data em sistemas de extrusão, Wenger aborda estes e outros desafios com inovações. Considerando estas recentes inovações da Wenger: OTD (Oblique Tube Die) e DCS (Diverging Cone Screw), resultaram em um incrível aumento de três a cinco vezes na produção de alimentos de pequeno diâmetro, comparado com as tecnologias anteriores; Extrusora Térmica de Rosca Dupla - que permite a adição de altas porcentagens de pasta de peixe, óleo e ingredientes de alta umidade nas formulações; Pré-Condicionador HIP com Intensidade de Mistura Ajustável, solucionam muitos desafios nas formulações - especialmente aqueles com diferentes conteúdos de amido, fibras e óleos. E a lista continua.

Entre em contato conosco agora mesmo. Com novos conceitos e liderança visionária, estamos prontos para ajudá-lo a ficar à frente da concorrência no setor de alimentos aquáticos, que sempre está em evolução.

Transformando idéias em oportunidades.

PROCESSAMENTO PROGRESSIVO EM ALIMENTOS AQUÁTICOS.

O que esperar do futuro

JOSÉ MAURICIO BERNARDI – Diretor de Vendas Wenger - América Latina.

TEL: +55 – 19 – 3881 5060 CEL: +55 – 19 – 99772 2809

E-MAIL: MAURICIOB@WENGER.COM

WENGER®

wenger.com

BELGIUM TAIWAN BRASIL CHINA TURKEY INDIA

Não transgênicos



Transgênicos



Figura 6: Zebrafish (*Danio rerio*) não transgênicos (peso médio = 0.68 g \pm 0.13) e transgênicos (peso médio = 1.79 g \pm 0.37) com 12 meses de idade. (Fonte: Figueiredo et al., 2007)

A primeira espécie de peixe com potencial comercial utilizada na manipulação genética no Brasil foi o jundiá (*Rhamdia quelen*). Esse estudo foi desenvolvido na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) com intuito de avaliar o uso de espermatozoides como vetores de DNA exógeno. O desenvolvimento de protocolos usando as células espermáticas como vetores de DNA exógeno é importante para espécies que produzem ovos pequenos e opacos, em que a microinjeção não é possível de ser realizada. Além disso, permite a produção de transgênicos em massa, diferente da microinjeção, a qual só pode ser realizada em um único embrião. Nesse mesmo sentido, as células espermáticas do linguado *Paralichthys orbignyanus* já foram geneticamente manipuladas com sucesso por pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), porém nenhum organismo transgênico foi produzido.

Por fim, se considerarmos o potencial da transgenia para piscicultura e a possibilidade futura de liberação de peixes transgênicos para consumo humano, o domínio dessa tecnologia pela indústria aquícola brasileira é indispensável. Pesquisas sobre outros genes de interesse para piscicultura ainda são necessárias para que possam ser usadas como alternativa ao GH. Em nosso próximo encontro, iremos discutir um fenômeno genético que ocorre frequentemente em pisciculturas, a endogamia. ■

Leitura complementar

- Collares, T., 2005. Animais Transgênicos - Princípios & Métodos, Sociedade Brasileira de Genética, Riberão Preto, Brasil, 348 pp.
- Collares, T., Seixas, F.K., Campos, V.F., Cavalcanti, P.V., Deschamps, J.C. 2007. Animais transgênicos biorreatores. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 31: 462-478.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagl, C.A., Donaldson, E.M., Swanson, P., Chan, W.K., 1994. Extraordinary salmon growth. Nature 371: 209-210.
- Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2007. Improving the production of transgenic fish germlines: In vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. Genetics and Molecular Biology, 30: 31-36.
- Gong, Z., Wan, H., Tay, T.L., Wang, H., Chen, M., Yan T., 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. Biochemical and Biophysical Research Communications, 308: 58-63.
- Hallerman, E.M., McLean, E., Fleming, I.A., 2007. Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: A review identifying research needs. Applied Animal Behaviour Science, 104: 265-294.
- Ledford, H., 2013. Transgenic salmon nears approval. Nature, 497: 17-18.
- Quirino, B., F., 2008. Revolução dos Transgênicos. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 172 p.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T., 2007. Biotechnology in Aquaculture: Transgenics and Polyploidy. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 6: 2-16.
- Van Eenennaam, A.L. & Muir, W.M., 2011. Transgenic salmon: a final leap to the grocery shelf? Nature Biotechnology 29:706-710.

Glossário:

Transcrição: Processo biológico de produção de RNA a partir de trechos específicos da cadeia-molde de DNA.

Vetor de expressão: São sequências de DNA construídas em laboratório que contém todos os elementos necessários para expressão de uma proteína.

Biofábricas: São animais e plantas transgênicas que expressam proteínas de interesse farmacológico (como hormônios) ou nutricional (vitaminas).

Promotor: É uma sequência de DNA adjacente a um gene que regula e inicia a produção de RNA mensageiro para produção de uma proteína.

Proteína anticongelante: São proteínas produzidas por certos vertebrados, plantas, fungos e bactérias que permitem a esses organismos sobreviverem em ambientes de temperatura abaixo de zero. Muito comum em peixes que habitam as águas dos pólos.