



CLONAGEM DO NEUROPEPTÍDEO Y DO LINGUADO *Paralichthys orbignyanus*

CAMPOS, Vinicius^{1*}; LANES, Carlos Frederico²; ROBALDO, Ricardo³; MARINS, Luis Fernando²; SEIXAS, Fabiana¹; COLLARES, Thaís¹; GONÇALVES, Breno¹; FRANCO, Adeline¹; SILVA, Evelise¹; KAEFER, Cristian¹; COLLARES, Tiago¹; DESCHAMPS, João¹

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Campus Unversitário s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS.

²Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Av. Itália, Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande, RS.

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Campus Unversitário s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS.

*Autor para correspondência: Tel: (53) 3275-7588
E-mail: vcampos_ib@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A regulação da ingesta de alimento em vertebrados é um complexo processo em que diferentes rotas moleculares atuam. Entre as várias moléculas sinalizadoras envolvidas nestas rotas está o neuropeptídeo Y (NPY), o qual desempenha papel chave como neurotransmissor e neuromodulador na ingesta de alimento e no balanço energético (Aldegunde & Mancebo, 2006).

Em mamíferos o NPY é um potente estimulador da ingesta. Várias evidências sugerem que o NPY está também envolvido na homeostase energética em peixes, onde isto tem sido recentemente observado, uma vez que a administração intracerebroventricular de NPY estimula a ingesta em *Ictalurus punctatus* (Silverstein et al., 2000) e em *Carassius auratus* (Narnaware et al., 2001).

Além disso, vários trabalhos têm demonstrado que o NPY é encontrado em todo o tecido cerebral, sugerindo a participação em outros processos fisiológicos (Aldegunde & Mancebo, 2006). Entre estes outros processos está a relação com a expressão do GnRH, demonstrando uma atuação no controle da puberdade em mamíferos (Plant e Shahab, 2002).

Entretanto, em peixes pouco se conhece sobre o papel do NPY no controle da ingesta alimentar e sobre a sua participação na liberação do GnRH. O linguado *Paralichthys orbignyanus* torna-se um interessante modelo experimental por ser a espécie com maior valor econômico na região sul do Brasil e com alto potencial produtivo. Neste sentido, a clonagem do NPY para esta espécie é fundamental para estudos de expressão gênica para identificação do papel do NPY na ingesta de alimento e na reprodução desta espécie e de outros teleósteos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análises *in silico*

Para a clonagem do NPY do linguado foram desenhados primers a partir do alinhamento de seqüências de cDNA do NPY de outras espécies de peixes com auxílio do software online GeneFisher, version 2.0.

2.2. Extração de RNA

Dois animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta do cérebro que foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total que foi realizada com a utilização o reagente TRIzol[®] (Invitrogen[®], USA) de acordo com instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado com o fluorômetro Qubit[™] (Invitrogen[®], USA) para a posterior confecção do cDNA.

2.3. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado com a enzima SuperScript III[™] Reverse Transcriptase (Invitrogen[®], USA) de acordo com instruções do fabricante. Para a confirmação da síntese foi realizada um reação de RT-PCR para amplificação do gene housekeeping da beta-actina do linguado.

2.4. RT-PCR e seqüenciamento

Com os primers construídos previamente com auxílio das análises *in silico* foram realizadas reações de RT-PCR para o isolamento do NPY do *P. orbignyanus*. As reações de RT-PCR foram realizadas com 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com desna turação inicial de 1 minuto e extensão final de 5 minutos. O produto das reações foi verificado em eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen[®], USA) e seqüenciados em seqüenciador automático Mega BACE 500 DNA sequencer[®] (Amersham Biosciences, Suécia).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das análises *in silico* foram construídos dois pares de primers: um par de primer degenerado, construído baseado em regiões conservadas entre as diferentes espécies de peixes e outro construído para a seqüência do *P. olivaceus*. Ambos os primers funcionaram amplificando os fragmentos nos tamanhos esperados, onde na figura 1 pode se visualizar na amostra A1 o fragmento amplificado pelo par de primers degenerado e na amostra A2 o fragmento amplificado pelo par de primers para o *P. olivaceus*.

M A1 A2

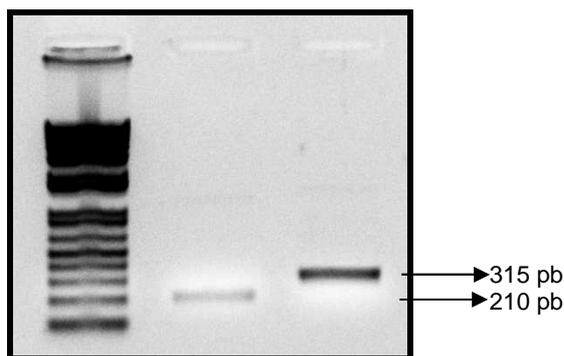


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1%, demonstrando a amplificação dos fragmentos de aproximadamente (A1) 210 pb e (A2) 315 pb. M = marcador 1 Kb DNA plus ladder (Invitrogen® USA).

Estes fragmentos foram clonados no vetor pCR®4-TOPO® para o seqüenciamento que confirmou a clonagem do NPY do linguado como visto na figura 2 no Blast com as seqüências depositadas no GenBank

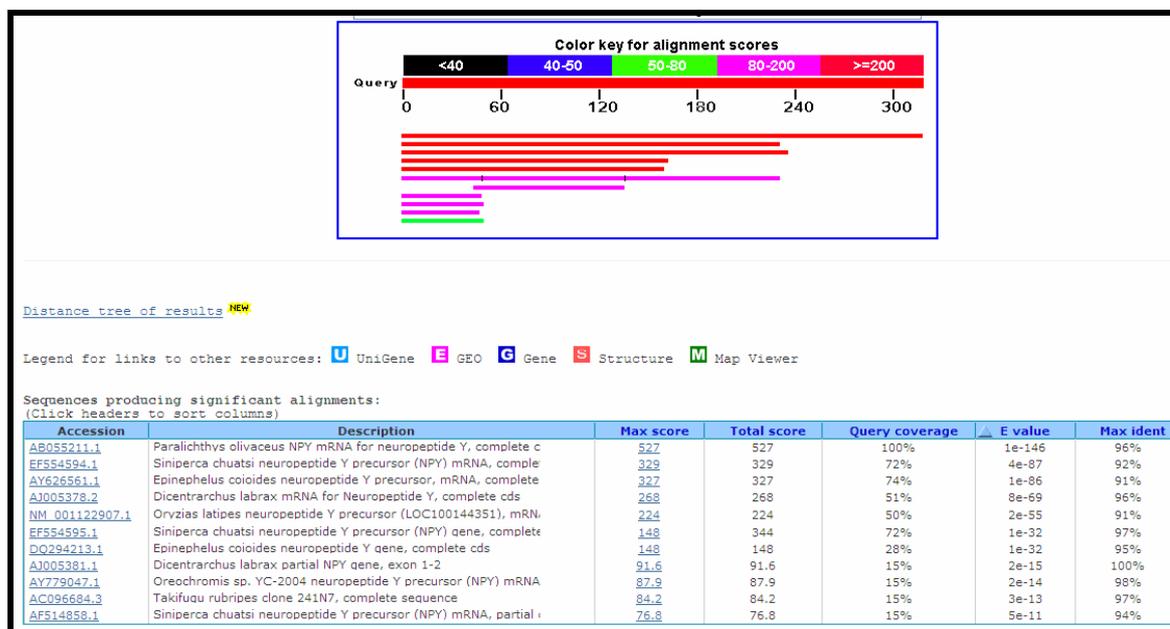


Figura 2. Blast do NPY do linguado com as sequencias do GenBank.

Outros estudos como este já foram realizadas para outras espécies (Kehoe & Volkoff, 2007), entretanto pouco se sabe sobre os níveis de expressão deste peptídeo durante o ciclo alimentar, tanto em peixes quanto em mamíferos, e sobre a sua influência na puberdade, neste sentido, este resultado traz uma importante contribuição no estudo do metabolismo energético em peixes possibilitando que outros estudos possam ser realizados como avaliação da expressão do NPY por PCR em tempo real para determinação dos níveis de RNA mensageiro deste neurotransmissor, bem como a produção do NPY recombinante do linguado em *E. coli* para a realização de ensaios de administração do peptídeo recombinante e determinação do seus efeitos no balanço energético e na reprodução desta importante espécie.

4. CONCLUSÕES

A clonagem de dois fragmentos de 210 pb e 315 pb do NPY do linguado foi realizada com sucesso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDEGUNDE, M., MANCEBO, M. Effects of neuropeptide Y on food intake and brain biogenic amines in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Peptides**, 2006, v.27, p.719-727.

CASTRO, A., BECERRA, M., MANSO, M.J., ANADON, R. Development of immunoreactivity to neuropeptide Y in the brain of brown trout (*Salmo trutta fario*). **J. Comp. Neurol.**, 1999, v. 414, p.13-32.

KEHOE, A.S., VOLKOFF, H. Cloning and characterization of neuropeptide Y (NPY) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, 2007, v. 146, p.451-461.

NARNAWARE, Y.K., PETER, R.E. Neuropeptide Y stimulates food consumption through multiple receptors in goldfish. **Physiol. Behav.**, 2001, v.74, p.185-190.

PLANT, T.M., SHAHAB, M. Neuroendocrine mechanisms that delay and initiate puberty in higher primates **Physiol. Behav.**, 2002, v. 77, p.717-722.

SILVERSTEIN, J.T., PLISETSKAYA, E.M. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. **Am. Zool.**, 2000, v.40, p.296-308.