



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SUBUNIDADES
ALFA E BETA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE DE PIRARUCU
(*Arapaima gigas*) VISANDO SUA SÍNTESE EM CÉLULAS CHO**

Roberto Feitosa de Carvalho

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Prof. Dr. Paolo Bartolini

São Paulo
2014

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SUBUNIDADES
ALFA E BETA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE DE PIRARUCU
(*Arapaima gigas*) VISANDO SUA SÍNTESE EM CÉLULAS CHO**

Roberto Feitosa de Carvalho

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-
Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Paolo Bartolini

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2014

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Juvenal Severiano de Carvalho** e **Maria Auxiliadora Feitosa** por toda ajuda e apoio durante esta jornada.

Ao amigo **Vander** por ter me incentivado a ingressar em um curso de nível superior.

Ao amigo **Marcos Vinicius Nucci Capone** por ter me apresentado o universo do caminho científico.

À minha futura esposa **Vanessa Ribeiro** por toda compreensão, companheirismo, abnegação e apoio durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir o meu regresso em busca da regeneração, e por me emprestar este título para que com ele eu possa beneficiar o maior número de pessoas possíveis.

Ao meu “pai” científico, Prof. Dr. Paolo Bartolini pela orientação, sugestões, apoio, determinação, garra e ensino.

À Dra. Riviane Garcez pela grande contribuição na parte de estudos filogenéticos.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares pela participação na entrevista que possibilitou o meu ingresso nesta instituição.

À Prof. Dra. Cibele Nunes Peroni pela contribuição neste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Teresa Carvalho Pinto Ribela por todo incentivo e ajuda.

À Prof. Dra. Regina Affonso pelas várias dúvidas sanadas durante esta trajetória.

Ao Prof. Dr. Paulo Sergio Cardoso por dar início a corrente de estudantes da Universidade Nove de Julho que ingressaram no IPEN.

Ao Prof. Dr. Marco Roberto por todo incentivo.

Ao Dr. João Ezequiel (Johnny) por estar sempre pronto a ajudar quando precisei.

Aos meus familiares por me incentivaram a não desistir no meio da jornada.

Ao amigo Marcos Vinicius Nucci Capone que participou ativamente no meu processo de seleção para o ingresso nas atividades científicas.

Ao amigo Flávio Sousa Silva pelas ideias trocadas.

À amiga Letícia do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) pela preciosa ajuda na disciplina de física nuclear

À companheira Thais Cristina dos Anjos Sevilhano por estar sempre por perto nos momentos em que precisei.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- Arlete, Dra. Beatriz, Dra. Claudia, Caroline Elias, Dr. Daniel Perez, Daniela, Eliana, Eliza, Ed, Flávia, Fernanda Arthuso, Geiza, Hugo, Ivete, José Maria, Junqueira, Dra. Kayo, Karina Corleto, Laura, Mayara, Dra. Miriam, Dra. Marina, Mosca, Dra. Nanci, Neia, Gisleine, Sandra, Natan, Dr. Nélio, Neide, Dra. Olga, Dr. Patrick, Patrícia, Rute, Dra. Natália Malavasi, Dra. Renata, Rosangela, Dr. Vincent, Tamara, pelos bons momentos, colaboração, amizade e compreensão.

À todos os funcionários do Centro de Biotecnologia que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao IPEN, FAPESP, CNPq, CAPES pelo apoio financeiro e técnico.

No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.

(Ayrton Senna)

Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.

(Albert Einstein)

CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SUBUNIDADES ALFA E BETA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE DE PIRARUCU (*ARAPAIMA GIGAS*) VISANDO SUA SÍNTESE EM CÉLULAS CHO

Roberto Feitosa de Carvalho

RESUMO

O Pirarucu (*Arapaima gigas*) é um peixe gigante da família *Arapaimidae*, nativo das bacias amazônicas que pode chegar a dois metros de comprimento e pesar mais de 200 Kg. Está presente no Equador, na Colômbia, no Peru, na Bolívia e no Brasil. Atualmente a espécie está ameaçada de extinção devido à pesca predatória e ao aumento da presença humana em seus viveiros naturais. No presente trabalho, os cDNAs da subunidade α (ag-GTH α) e da subunidade β do hormônio folículo estimulante de *A. gigas* (ag-FSH) foram isolados e clonados pela primeira vez, possibilitando uma melhor compreensão da diversidade e evolução desta glicoproteína em peixes e a futura síntese biotecnológica deste hormônio para fins reprodutivos e alimentícios. Tanto o cDNA do ag-GTH α quanto aquele do ag-FSH β foram sintetizados pela reação de transcriptase reversa (RT) e pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando como molde RNA total proveniente das glândulas hipofisárias de *A. gigas*. O cDNA da subunidade ag-GTH α possui uma sequência codificadora (*Open Reading Frame*, ORF) de 348 pb, o que corresponde a uma proteína de 115 aminoácidos com um suposto peptídeo sinal de 24 aminoácidos e com um peptídeo maduro de 91 aminoácidos. Dez resíduos de cisteínas responsáveis pela formação de cinco pontes dissulfeto, dois sítios de N-glicosilação e três resíduos de prolina apresentaram-se altamente conservados quando comparados com outras espécies de peixes. A comparação baseada em sequências de aminoácidos de GTH α de 38 espécies de peixes revelou alta identidade do *A. gigas* com membros das seguintes ordens: Acipenseriformes, Anguiliformes, Siluriformes e Cypriniformes (87,1-89,5%), e, a menor identidade

com os Gadiformes e Cyprinodontiformes (55%). A identidade com a análoga sequência de GTH α de *Homo sapiens* foi de 67%. Para a subunidade ag-FSH β , a ORF correspondente foi de 381 pb, produzindo uma proteína de 126 aminoácidos com um peptídeo sinal de 18 e um peptídeo maduro de 108 aminoácidos. Quando comparado com as sequências de *Anguilla marmorata*, *Acipenser gueldenstaedtii* e *Homo sapiens*, o peptídeo maduro de ag-FSH β mostrou conter 12 resíduos de cisteínas responsáveis pela formação de seis pontes dissulfeto, duas prolinas e um sítio de glicosilação perfeitamente conservados, apresentando identidades de 63, 50 e 45% respectivamente em suas sequências de aminoácidos. As árvores filogenéticas construídas mostraram, em geral, que o *A. gigas*, da ordem dos Osteoglossiformes, se apresenta como grupo irmão dos Clupeocefala, enquanto os Elopomorpha (Anguiliformes) formam o grupo mais basal de todos os teleósteos aqui analisados.

**CLONING, CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF
THE ALPHA AND BETA SUBUNITS OF THE FOLLICLE STIMULATING
HORMONE OF PIRARUCU (*ARAPAIMA GIGAS*) IN VIEW OF ITS SYNTHESIS
IN CHO CELLS**

Roberto Feitosa de Carvalho

ABSTRACT

Pirarucu (*Arapaima gigas*) is a giant fish of the Arapaimidae family native to the Amazon river basin, that can reach 3 meters in length, weighing up to 250 Kg. It is present in Ecuador, Colombia, Peru, Bolivia and Brazil. This species is in danger of disappearing due to exploitation by the fishing industry and increasing human presence in its natural habitat. In the present work the cDNAs of the gonadotropin α -subunit (ag-GTH) and of follicle-stimulating hormone β subunit (ag-FSH β) were isolated and cloned for the first time. As a consequence, a better understanding of the diversity and evolution of this glycoprotein in fish and its future biotechnological synthesis for reproductive and alimentary purposes will be possible. Both cDNAs of ag-GTH α and ag-FSH β have been synthesized via reverse transcriptase reaction (RT-PCR) and polymerase chain reaction (PCR) using as a template total RNA extracted from *A. gigas* pituitary glands. Ag-GTH α -subunit has a coding sequence (open reading frame, ORF) of 348 bp, corresponding to a 115 amino acid protein, with a putative signal peptide of 24 aminoacids and a mature peptide of 91 amino acids. Ten cysteine residues, responsible for the formation of five disulfide linkages, two N-glycosylation sites and three proline residues were found highly conserved when compared to other fish species. A comparison based on the amino acid sequence of the GTH α -subunit from 38 different species of fish showed high identity of *A. gigas* with members of the following orders: Acipenseriformes, Siluriformes and Cypriniformes (87.1-89.5%), while the lowest identity was found with Gadiformes

and Cyprinodontiformes (55%). In comparison with the analogous sequence of *Homo sapiens* an identity of 67% was found. For the ag-FSH β subunit an ORF of 381 bp, coding for a 126 amino acid protein, with a signal peptide of 18 and a mature peptide of 108 amino acids, was found. When compared with the *Anguilla marmorata*, *Acipenser gueldenstaedtii* and *Homo sapiens*, the mature peptide of ag-FSH β showed the presence of the twelve cysteine residues responsible for the formation of six disulfide linkages, two proline residues and one glycosylation site, all of them perfectly conserved. The identity with the mentioned species were 63, 50 and 45% respectively. The obtained phylogenetic trees have shown, in general, that *A. gigas* of the order of Osteoglossiformes appears as sister group of Clupeocephala, while Elopomorpha (Anguilliformes) forms the most basal group of all analyzed teleosts.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 MATERIAL	10
3.1.1 Material utilizado na extração de RNA total.....	10
3.1.2 Material utilizado no isolamento das subunidades α e β de ag-FSH.....	10
3.1.3 Material utilizado na análise de ácidos nucleicos.....	10
3.1.4 Material utilizado na construção de vetores dicistrônicos.....	11
3.1.4.1 Enzimas.....	11
3.1.4.2 Vetores.....	11
3.1.4.3 Reagentes químicos.....	11
3.1.5 Material utilizado no cultivo celular.....	12
3.1.5.1 Meios de cultura.....	12
3.1.5.2 Linhagem celular.....	12
3.1.5.3 Material plástico estéril.....	12
3.1.5.4 Reagentes utilizados no cultivo celular.....	12
3.1.6 Equipamentos e acessórios principais.....	13
3.1.7 Materiais diversos.....	14
3.2 MÉTODOS	14
3.2.1 Coleta de animais e remoção da glândula hipofisária.....	14
3.2.2 Extração de RNA total.....	15
3.2.3 Desenho de <i>primers</i> consenso e transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase.....	15
3.2.4 Amplificação rápida das extremidades finais do cDNA (RACE).....	19
3.2.5 Análise por gel de agarose.....	22
3.2.6 Purificação enzimática dos produtos das reações de PCR.....	22
3.2.7 Extração do produto de PCR do gel de agarose.....	22
3.2.8 Quantificação dos ácidos nucleicos.....	23
3.2.9 Sequenciamento do cDNA obtido.....	23

3.2.10	Introdução das subunidades α e β em vetores de expressão dicistrônicos.....	24
3.2.10.1	Obtenção das regiões codificadoras de ag-GTH α e de ag-FSH β com os sítios de restrição necessários.....	24
3.2.10.2	Preparo dos vetores de expressão	25
3.2.10.3	Ligação dos fragmentos de ag-GTH α e de ag-FSH β nos vetores de expressão.....	25
3.2.10.4	Transformação de bactérias competentes (<i>E. coli</i> DH5 α) com os vetores de expressão dicistrônicos.....	26
3.2.10.5	Seleção de colônias e detecção de clones positivos para cada um dos vetores de expressão.....	26
3.2.10.6	Midi preparação do DNA plasmídial relativo aos dois vetores de expressão	27
3.2.11	Cultivo celular.....	27
3.2.12	Transfecção de células CHO DHFR ⁻ com os vetores de expressão construídos.	27
3.2.13	Seleção e amplificação.....	28
3.2.14	Detecção por PCR do cDNA de ag-GTH α e de ag-FSH β durante amplificação gênica.....	28
3.2.15	Análise filogenética	29
4. RESULTADOS	30
4.1	Isolamento e análise do cDNA da subunidade alfa das gonadotrofinas (GTH) de <i>Arapaima gigas</i> (pirarucu).....	30
4.1.1	Extração de RNA total.....	30
4.1.2	RT-PCR e desenho de <i>primers</i> consenso com identificação de uma primeira sequência parcial de GTH α	30
4.1.3	Amplificação rápida das extremidades finais do cDNA (RACE) para o sequenciamento da subunidade ag-GTH α	32
4.1.4	Confirmação da sequência de cDNA do GTH α	33
4.1.5	Alinhamento das sequências de aminoácidos do GTH α de diferentes espécies... ..	34
4.1.6	Nível de identidade entre sequências de aminoácidos de ag-GTH α em diferentes ordens de peixes.....	36
4.1.7	Árvore filogenética construída comparando o peptídeo de ag-GTH α com aqueles de outras 37 espécies de peixes	37
4.2	Isolamento e análise do cDNA da subunidade beta do hormônio folículo estimulante (FSH) de <i>Arapaima gigas</i> (pirarucu)	38
4.2.1	RT-PCR e desenho de <i>primers</i> consenso com identificação de uma primeira sequência parcial de FSH β	38

4.2.2	Amplificação rápida das extremidades finais do cDNA (RACE) para o sequenciamento da subunidade ag-FSH β	40
4.2.3	Confirmação da sequência de cDNA de ag-FSH β	42
4.2.4	Alinhamento de sequências de aminoácidos de peptídeos de FSH β de diferentes espécies de peixes.....	43
4.2.5	Nível de identidade entre sequências de aminoácidos de FSH β em diferentes ordens de peixes.....	46
4.2.6	Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos de FSH β de diferentes espécies.....	46
4.2.7	Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas de cDNA de FSH β e de LH β de diferentes espécies de peixes.....	48
4.2.8	Construção dos vetores de expressão para síntese de ag-FSH.....	49
4.2.9	Teste de eficiência da transfecção.....	51
5. DISCUSSÃO	52
5.1	Isolamento e análise da subunidade alfa do FSH de <i>A. gigas</i>	52
5.2	Isolamento e análise da subunidade beta do FSH de <i>A. gigas</i>	55
5.3	Expressão do ag-FSH em células CHO.....	58
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Espécies de peixes utilizadas para desenho dos *primers* do GTH α . .16
- TABELA 2.** Espécies de peixes utilizadas para desenho dos *primers* do FSH β . .17
- TABELA 3.** Sítios de restrição e oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora do GTH α ou FSH β de *A. gigas*. Os sítios de restrição estão indicados em vermelho.24
- TABELA 4.** *Primers* utilizados na clonagem das subunidades do GTH α e do FSH β de *A. gigas*.31
- TABELA 5.** Percentual de identidade de peptídeos maduros de GTH α em diferentes ordens de peixes.36
- TABELA 6.** Percentual de identidade de peptídeos maduros de FSH β e de LH β de *A. gigas* em diferentes ordens de peixes. O FSH está apresentado acima da diagonal.46

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Região da Amazônia correspondente ao habitat natural do *A. gigas*. Fonte: Ochoa *et al.* (2005). 1
- FIGURA 2.** Exemplar de pirarucu retirado de seu habitat natural. Fonte: <http://www.infoescola.com/peixes/pirarucu/>. Acesso em 09 maio. 2014. 2
- FIGURA 3.** Mantas provenientes da carne de Pirarucu. Fonte: (WWF-BR- 2011). 3
- FIGURA 4.** Artesanato elaborado com escamas de pirarucu. Fonte: (WWF-BR-2011). 4
- FIGURA 5.** Esquema das principais etapas da transcrição reversa. Fonte: protocolo do kit *GoScript™ Reverse Transcription System* da Promega <<http://www.promega.com.br>>. 18
- FIGURA 6.** Esquema das principais etapas da técnica de 5' RACE. Fonte: protocolo do kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0. <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home.html>>. 20
- FIGURA 7.** Esquema das principais etapas da técnica 3' RACE. Fonte: protocolo do kit 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home.html>>. 21
- FIGURA 8.** Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. O primeiro poço representa o marcador de peso molecular e os demais poços as bandas 28s e 18s do RNA ribossomal de seis hipófises diferentes de *A. gigas*. 30
- FIGURA 9.** Banda de aproximadamente 400 pb relativa à primeira região parcial identificada no cDNA de ag-GTH α , juntamente com o marcador de peso molecular (1Kb). 32
- FIGURA 10.** Sequência de nucleotídeos e aminoácidos de ag-GTH α . M, metionina inicial; NIT e NHT, sítios de glicosilação; N, primeiro aminoácido do peptídeo maduro; C, cisteínas; p, prolínas; TAA, *stop codon*; attaaa, sinal de poliadenilação; aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (n=20), cauda de poly (A). 34
- FIGURA 11.** Alinhamento de sequências de aminoácidos de 37 espécies de peixes retiradas do *GenBank*, juntamente com a sequência encontrada de GTH α de *A. gigas*. 35

FIGURA 12. Árvore filogenética obtida pelo método de <i>neighbour joining</i> , relativa a peptídeos maduros de ag-GTH α , utilizando 12 ordens e 38 espécies de peixes, sendo que três Acipenseriformes foram usados como grupo externo para enraizar a árvore. Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 50% são apresentados abaixo dos ramos.....	37
FIGURA 13. Bandas obtidas mediante uso de <i>primers</i> consenso desenhados para identificar uma primeira sequência do gene do FSH β	39
FIGURA 14. Banda de 300 pb extraída do gel de agarose anterior e reamplificada, relativa à uma sequência parcial de cDNA de ag-FSH β	39
FIGURA 15. Banda relativa à sequência 5' UTR do cDNA de ag-FSH β	40
FIGURA 16. Banda de aproximadamente 700 pb relativa à região 3' UTR do cDNA de ag-FSH β	41
FIGURA 17. Sequência total de nucleotídeos e de aminoácidos de ag-FSH β . M, metionina inicial; NIT, sítio de glicosilação; G, primeiro aminoácido do peptídeo maduro; C, cisteínas; P, prolínas; TAG, <i>stop codon</i> ; TTT, sítio de glicosilação perdido; attaaa, sinal de poliadenilação; aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (n=20), cauda poly (A).....	42
FIGURA 18. Alinhamento de sequências de aminoácidos do FSH β de 40 espécies de peixes retiradas do <i>GenBank</i> , juntamente com a sequência de FSH β de <i>A.gigas</i>	44
FIGURA 19. Alinhamento de sequências de aminoácidos de FSH β e LH β de 40 espécies de peixes retiradas do <i>GenBank</i> , juntamente com aquelas de <i>A.gigas</i>	45
FIGURA 20. Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos do FSH β construída pelo método de <i>neighbour joining</i> , com 41 espécies diferentes de peixes, incluindo <i>A.gigas</i> . Três Acipenseriformes foram usados como grupo externo para enraizar a árvore. Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 50% são apresentados acima dos ramos.	47
FIGURA 21. Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas de cDNA de FSH β e de LH β de <i>A.gigas</i> , juntamente com outras 40 espécies de peixes. Três Acipenseriformes foram usados como grupo externo para enraizar a árvore. Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 50% são apresentados abaixo dos ramos para a árvore de máxima parcimônia, e acima dos ramos para a árvore de máxima verossimilhança.	48

FIGURA 22. Esquema do vetor de expressão para a subunidade alfa, incluindo o cDNA relativo ao GTH α de <i>A. gigas</i>	50
FIGURA 23. Esquema do vetor de expressão para a subunidade beta, incluindo o cDNA relativo ao FSH β de <i>A. gigas</i>	50
FIGURA 24. Gel de agarose corado com brometo de etídio, relativo a reações de PCR: (M) marcador de peso molecular (1Kb); (2) células não transfectadas, α ; (3) células não transfectadas, β ; (4 e 5) células transfectadas, α ; (6 e 7) células transfectadas, β	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ag – *Arapaima gigas*

AAP – *Abridged Anchor Primer*

AUAP – *Abridged Universal Amplification Primer*

AP – *Adapter primer*

CEGH – Centro de Estudos do Genoma Humano

CHO – Células de ovário de *hamster* chinês

CITES – *Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna*

DHFR⁻ – Diidrofolato redutase negativo

DHFR⁺ – Diidrofolato redutase positivo

E. coli – *Escherichia coli*

FSH – Hormônio folículo estimulante

GTH – Hormônio gonadotrófico

GSP – *Gene Specific Primer*

LB – Luria-Bertani

LH – Hormônio luteinizante

MTX – Metotrexato

ORF – *Open Reading Frame*

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RT – Transcriptase reversa

RACE – Amplificação rápida das extremidades finais de cDNA

SFBd – Soro fetal bovino dialisado

Taq – *Thermus aquaticus*

TSH – Hormônio estimulador da tireóide

UTR – *Untranslated region*

UV – Luz ultravioleta

Este trabalho foi redigido com base nas orientações do seguinte guia:

Igami, M.P.Z.; Zarpelon, L.M.C. (Org). Guia para elaboração de dissertações e teses: preparado para orientação dos alunos de Pós-graduação do IPEN. São Paulo: IPEN, Divisão de informação e documentação científica, 2002.

Disponível em:

<https://www.ipen.br/conteudo/upload/200609111605540.guia_teses.pdf>. Acesso em: 07/05/2014

1 INTRODUÇÃO

De um modo geral, a produção aquícola vem aumentando nos últimos anos no Brasil e no mundo. A aquicultura mundial produzia 20 milhões de toneladas em 1990, e em 2001 esses números já ultrapassavam 60 milhões de toneladas, 43% atribuídos aos ambientes de água doce (Borghetti *et al.* 2003). Esses números aumentaram mais ainda nos anos posteriores¹. No Brasil, a produção total de pesca e aquicultura passou de 700.000 toneladas em 1996 para um milhão de toneladas em 2005, sendo que o pirarucu (*Arapaima gigas*) não é citado na relação das vinte espécies mais cultivadas nos estados brasileiros². O *A. gigas* é nativo da Bacia Amazônica e alóctone na Bacia do São Francisco e de algumas regiões do Nordeste (portaria nº 145/98, de 29 de outubro de 1998 do Instituto Brasileiro do Meio ambiente, IBAMA). É possível observar na FIG. 1 a região relativa ao habitat natural desta espécie.



FIGURA 1. Região da Amazônia correspondente ao habitat natural do *A. gigas*.
Fonte: Ochoa *et al.* (2005).

¹ www.fao.org/fi/default.asp

² www.mpa.gov.br

Seu nome deriva de dois termos indígenas pira, “peixe”, e urucum, “vermelho”, devido à coloração avermelhada da sua cauda. É um peixe carnívoro e se apresenta potencialmente como uma das mais importantes espécies brasileiras para o extrativismo e criação comercial. Sua carne é saborosa, os adultos chegam a pesar mais de 200 kg e as relações ecológicas desse peixe dentro da comunidade são essenciais para a manutenção de diversos ecossistemas brasileiros. Na FIG. 2 é mostrado um exemplar de pirarucu retirado do seu habitat natural enquanto que na FIG. 3, é possível observar as mantas de carne de pirarucu.



FIGURA 2. Exemplar de pirarucu retirado de seu habitat natural. Fonte: <http://www.infoescola.com/peixes/pirarucu/>. Acesso em 09 maio. 2014.



FIGURA 3. Mantas provenientes da carne de Pirarucu. Fonte: (WWF-BR- 2011).

Além da carne, o pirarucu pode ainda oferecer alguns subprodutos que agregam valor à sua pescaria, tais como as escamas, o couro, a língua, o fígado e o coração. As escamas de coloração cinza com detalhes avermelhados são utilizadas para produção de colares, brincos e pulseiras (FIG. 4). O couro apresenta potencial de uso na indústria têxtil na fabricação de bolsas, sapatos e acessórios. A língua pode ser utilizada como lima para ralar o guaraná. O fígado e o coração podem ser transformados em patê. A cabeça do pirarucu pode ser ainda transformada em ensilada, um composto de alto valor proteico utilizado na produção de ração animal (WWF-BR- 2011).



FIGURA 4. Artesanato elaborado com escamas de pirarucu. Fonte: (WWF-BR-2011).

Esta espécie pertence à superordem *Osteoglossomorpha*, ordem Osteoglossiformes, família *Arapaimidae*, sendo considerada uma das espécies mais antigas entre os teleósteos vivos, que surgiram durante o período jurássico. Possui dois aparelhos respiratórios: as brânquias, para a respiração aquática, e a bexiga natatória modificada, especializada para funcionar como pulmão durante a respiração aérea, sendo que a cada 20 minutos, o pirarucu necessita subir até a superfície para captação de oxigênio. Existe um grande potencial para a criação comercial desta espécie na América Latina e diversos estudos e investigações

(Saint *et al.* 1986; Jégua *et al.* 1999; Piedade *et al.* 2004), se tornam necessários para sua conservação, porque seus estoques naturais estão sendo ameaçados com uma retirada maior que a permitida, constando também na lista de animais sobre explorados do IBAMA e/ou, em perigo de extinção de acordo com a “Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora” (CITES). Deste modo a sua criação comercial torna-se um objetivo importante para a manutenção e preservação da espécie, e diminuição da captura em estoques naturais.

De um modo geral, os peixes criados em cativeiro apresentam dificuldades na ovulação e na espermição. A mais grave é a falência completa na espermatogênese e na vitelogênese que ocorre, entre outras, em espécies como as enguias de água doce (gênero *Anguilla*), no írio (*Seriola dumerilii*) e nas fêmeas de tainhas (*Mugil cephalus*), que parecem ter uma disfunção na vitelogênese proveniente do início da gametogênese (Fontaine 1975). Outro tipo de disfunção é a ausência da maturação final dos ovócitos, que ocorre na maior parte das espécies que apresentam falência reprodutiva como o *Paralichthys dendatus* (Berlinski *et al.* 1997). Existe, enfim a falência que está associada à ausência da ovulação no final do ciclo reprodutivo. É o caso dos salmonídeos, nos quais os óvulos tendem a ser reabsorvidos (Bromage *et al.* 1992).

Todas as falências reprodutivas mencionadas estão ligadas a fatores hormonais do eixo hipotálamo-hipófise. Os hormônios glicoproteicos da hipófise dos vertebrados são as gonadotrofinas (GTHs) e a tireotrofina (TSH). As GTHs compreendem o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Estes três hormônios hipofisários são compostos por duas subunidades, chamadas de subunidade α e subunidade β , ligadas de forma não covalente. De um modo geral, a subunidade α se apresenta comum para os três tipos de hormônios glicoproteicos, enquanto que a subunidade β é hormônio-específica e determina a sua atividade hormonal mediante interação com seus receptores.

De acordo com trabalhos disponíveis na literatura podemos citar o trabalho pioneiro de Suzuki e colaboradores (1988), onde é reportada a purificação e caracterização de duas gonadotrofinas quimicamente diferentes do *Chum salmon* e a conseqüente proposta de que existem duas formas diferentes de gonadotrofinas nos teleósteos. Após este evento, um grande número de

espécies de peixes tiveram os cDNAs relativos a seus hormônios gonadotróficos clonados e caracterizados. É possível citar com base na literatura a clonagem dos cDNAs das subunidades α e β do FSH e LH das seguintes espécies de peixes: *Carassius auratus* (Kobayashi *et al.* 1997; Yoshiura *et al.* 1997), *Atlantic halibut* (Weltzen *et al.* 2003), *Acipenser gueldenstaedtii* (Hurvitz *et al.* 2005), *Sebastes schlegeli* (Kim *et al.* 2005), *Brachymystax lenok* (Choi *et al.* 2005), *Danio rerio* (So *et al.* 2005), *Senegalese sole* (Cerdà *et al.* 2008), *Marbled eel* (Huang *et al.* 2009), *Chinese sturgeon* (Cao *et al.* 2009) e *Atlantic cod* (Mittelholzer *et al.* 2009). Dentre os autores citados, Kim *et al.* (2005), Choi *et al.* (2005), So *et al.* (2005) e Huang *et al.* (2009) também apresentaram árvores filogenéticas incluindo as subunidades α e β destas gonadotrofinas. No que diz respeito à expressão heteróloga de FSH ou LH, é importante mencionar que estas glicoproteínas, de *Carassius auratus*, foram obtidas via baculovírus em larvas do bicho da seda (Kobayashi *et al.* 2003) como também em leveduras *Pichia pastoris* para a *Anguilla japônica* (Kamei *et al.* 2003), Tilápia (Kasuto e Levavi-Sivan 2005; Aizen *et al.* 2007) e *Zebrafish* (Yu *et al.* 2010). Também podemos citar que foi obtida em células CHO a expressão estável ou transiente de ambas as gonadotrofinas da truta da Manchúria (Choi *et al.* 2005) e as do *Zebrafish* (So *et al.* 2005). Com exceção do grupo de pesquisa liderado por Kazeto Yokinori que sintetizou e purificou o FSH e LH de *Anguilla japônica* (Kazeto *et al.* 2008), ou *Channel catfish* (Zmora *et al.* 2007) obtidos em células S2 de drosófila, as gonadotrofinas recombinantes não foram extensivamente purificadas e caracterizadas na maioria dos trabalhos citados, sendo apenas analisadas principalmente por SDS-PAGE e *Western blotting*, e posteriormente testadas em bioensaios.

As investigações relativas ao LH e FSH em peixes iniciam-se pelo sequenciamento e caracterização das suas subunidades (Degani *et al.* 2003) e posterior ligação das cadeias α e β em vetores de expressão para a síntese do hormônio recombinante (Kasuto *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2005). A clonagem e a expressão do LH/FSH recombinantes merecem também alguns cuidados na escolha dos vetores de expressão. Sendo que o FSH é uma glicoproteína formada por duas subunidades (heterodimérica) que devem ser expressas por um vetor e em hospedeiros que permitam sua glicosilação. É importante lembrar que as subunidades α e β obtidas não podem ser tóxicas para o hospedeiro, nem para

o vetor de expressão (Narayan *et al.* 2000; Shein *et al.* 2003). A utilização de vetores de expressão dicistrônicos, contendo o gene de interesse na região 5' e um gene marcador de seleção na região 3' do vetor, tem se mostrado uma abordagem bem sucedida para obtenção de células que expressam altos níveis de um gene de interesse na região 5' do vetor (Kaufman *et al.* 1991). Peroni e colaboradores (2002), obtiveram altos níveis de expressão do hormônio natural humano estimulador da tireóide hTSH e de sua forma humanizada (Damiani *et al.* 2009), mediante utilização destes vetores de expressão dicistrônicos.

Na literatura existem diversos trabalhos publicados pela equipe do Centro de Biotecnologia do IPEN, que já realizou vários estudos relativos à clonagem, expressão em células de ovário de *hamster* chinês (CHO) e produção (Ribela *et al.* 2003; Ventini *et al.* 2011), purificação (Mendonça *et al.* 2005); (Oliveira *et al.* 2007) e caracterização (Oliveira *et al.* 2003); (Loureiro *et al.* 2006); (Ribela *et al.* 2006); (Oliveira *et al.* 2008); (Carvalho *et al.* 2009); (Damiani *et al.* 2009); (Almeida *et al.* 2010; 2011; 2012) destas mesmas glicoproteínas hormonais humanas (TSH, FSH e LH).

Também existem outros sistemas de expressão de proteínas recombinantes descritos na literatura, como por exemplo, o sistema de expressão em leveduras. Kasuto *et al.* (2005) obtiveram LH de tilápias em levedura *Pichia pastoris*, enquanto Vischer *et al.* (2003), LH e FSH de peixe-gato africano em espécies de protozoários ameboides, que vivem no solo (*Dictyostelium discoideum* cepa AX3). Todos os LH/FSH/TSH recombinantes mencionados foram obtidos com suas cadeias glicosiladas, sendo biologicamente ativos.

No *A. gigas*, a gametogênese e suas relações com as GTHs ainda não foram investigadas. Existem alguns estudos que abordam o desenvolvimento gonadal (Godinho *et al.* 2005), o manejo, a alimentação de alevinos (Cavero *et al.* 2003) e o planejamento de criações (Chavez *et al.* 2002). Borella e colaboradores (2008) realizaram estudos bastante interessantes com ênfase na identificação e distribuição das células hipofisárias de pirarucu. No entanto, não existem estudos a respeito dos hormônios envolvidos na gametogênese e na formação de seus espermatozoides e ovócitos e nem, obviamente, a respeito de sua síntese. A partir disso, o presente trabalho clonou e sequenciou pela primeira

vez o cDNA das subunidades α e β de ag-FSH, realizando estudos filogenéticos e visando sua síntese em células CHO. Foi ampliada assim a possibilidade de investigação nas áreas de endocrinologia e reprodução do *A. gigas* e de outros teleósteos, tendo também como objetivo o incremento e manejo da fertilidade desta espécie, especialmente quando criada no cativeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é a clonagem, a caracterização e a realização de estudos filogenéticos das subunidades α e β do hormônio folículo estimulante de *Arapaima gigas*, visando sua síntese em células CHO.

2.2 Objetivos Específicos

- Coleta de animais e remoção da glândula hipofisária;
- Extração de RNA total;
- Construção de *primers* específicos para cada uma das subunidades e transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR);
- Amplificação rápida das extremidades finais do cDNA (RACE);
- Sequenciamento de DNA complementar (cDNA) de ag-GTH α e ag-FSH β ;
- Análise filogenética de ag-GTH α e ag-FSH β ;
- Clonagem das subunidades α e β em vetores de expressão dicistrônicos;
- Transfecção de células CHO DHFR⁻ com vetores de expressão contendo as subunidades α e β de FSH de *A. gigas*.
- Determinação do nível de expressão de ag-FSH e sua caracterização (em andamento).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material utilizado na extração de RNA total

- Sistema de extração RNA total *Purelink Micro-to-Midi total RNA mini purification kit*, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).
- Cápsula de evaporação, diâmetro 50 mm, capacidade 50 mL Prolab (São Paulo, Brasil).
- Bastão de vidro, dimensões 5 mm X 300 mm, Prolab (São Paulo, Brasil).
- Nitrogênio líquido, White Martins (São Paulo, Brasil).
- 2-Mercaptoetanol, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Dietilpirocarbonato, Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- *RNA Later*[®], Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

3.1.2 Material utilizado no isolamento das subunidades α e β de ag-FSH

- Sistema *SuperScript*[®] *III Reverse Transcriptase*, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).
- Sistema *GoScript*[®] *Reverse Transcription System*, Promega (Madison, WIS, EUA).
- Sistema *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends*, Versão 2.0, Invitrogen[®] (Carlsbad, CA, EUA).
- Sistema *3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends*, Invitrogen[®] (Carlsbad, CA, EUA).
- Oligonucleotídeos, *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA).

3.1.3 Material utilizado na análise de ácidos nucleicos

- Agarose ultrapura, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).
- Brometo de etídio, Merck (São Paulo, Brasil).
- Sistema de sequenciamento *BigDye*[®] *Terminator v3.1 Cycle sequencing kit*, Applied Biosystems[®] (Foster City, CA, EUA).

3.1.4 Material utilizado na construção de vetores dicistrônicos

3.1.4.1 Enzimas

- T4 DNA ligase, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- *FastDigest XbaI*, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- *FastDigest SmaI*, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- *FastDigest EcoRI*, Thermo Scientific (São Paulo, Brasil).
- Taq DNA Polimerase, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).
- Sistema para extração de DNA plasmídial, Nucleobond[®] Xtra Midi (Düren, Alemanha).

3.1.4.2 Vetores

- Vetor pEDdc e pEAdc, fornecidos gentilmente pelo Dr. C. R. Wood (Genetics Institute, Cambridge, MA, EUA), que possuem os marcadores gênicos DHFR (Dihidrofolato redutase) e ADA (Adenosina deaminase), respectivamente.

3.1.4.3 Reagentes químicos

- Ácido acético glacial P.A., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Ácido clorídrico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido bórico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido etilenodiamino tetra-acético P.A., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Cloreto de sódio, Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio monobásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio dibásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Glicerol, Merck (São Paulo, Brasil).
- Tris, Sigma (St. Louis, MO, EUA).

3.1.5 Material utilizado no cultivo celular

3.1.5.1 Meios de cultura

- *Minimum Essential Medium (α -MEM)* sem nucleosídeos, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA).
- Meio sem soro, CHO-S-SFM II, com nucleosídeos (hipoxantina e timidina), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).
- *Minimum Essential Medium (α -MEM)*, com nucleosídeos (hipoxantina e timidina), Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA).

3.1.5.2 Linhagem celular

- Células CHO DXB-11 mutantes, deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR⁻).

3.1.5.3 Material plástico estéril

- Pipetas de 1, 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Placas de petri de 10 cm de diâmetro, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Sistema de filtração de 500 mL, 0,22 μ m, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Tubos criogênicos de 2 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Tubos para centrífuga de 15 e 50 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA).
- Tubos eppendorf de 0,5 e 1,5 mL (Hamburgo, Alemanha).

3.1.5.4 Reagentes utilizados no cultivo celular

- Anfotericina B, *Fungizone*[®], Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA).
- Bicarbonato de sódio P.A., Synth (São Paulo, Brasil).
- Sulfato de gentamicina, Shering-Plough (Rio de Janeiro, Brasil).
- Metotrexato (MTX), Sigma (St. Louis, MO, EUA).
- Dimetilsulfóxido (DMSO), MERK (São Paulo, Brasil).
- Penicilina – Estreptomina, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA).
- Soro fetal bovino dialisado, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA).

- Soro fetal bovino, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA).
- Tripsina, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA).

3.1.6 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético com 5 posições Bell-enniun[®], Bellco (Vineland, NJ, EUA).
- Agitador magnético modelo 258, Fanen (São Paulo, Brasil).
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil).
- Autoclave horizontal, modelo speedclave II 12L, Odontobras (São Paulo, Brasil).
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich. Suíça).
- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich. Suíça).
- Banho-maria, modelo 146, Fanen (São Paulo, Brasil).
- Câmara de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha).
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super Speed RC – 28, Sorvall (Newtown, Connecticut, EUA).
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5810R, Eppendorf, Alemanha.
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil).
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Espectrofotômetro, modelo Ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia).
- Estufa de cultura celular, modelo 3159, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fluxo laminar classe II A/B, modelo 1140, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra).
- Fotodocumentador, modelo Minibis Pro, DNR Image systems, (Jerusalém, Israel).

- Frascos com volume nominal de 250 mL, Bellco (Vineland, NJ, EUA).
- Freezer -20 °C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil).
- Freezer -40 °C, modelo AB240, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Freezer -80 °C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA).
- Leitor de microplacas modelo Original Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, EUA).
- Medidor digital de pH, modelo 420, Orion (Boston, MA, EUA).
- Micro-centrífuga, modelo 5415P, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha).
- NanoDrop, modelo N 2000 (West Virginia, DE, EUA)
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Locator Jr., Thermolyne (Dubuque, IA, EUA).
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).
- Termociclador Veriti 96 poços, Applied Biosystems® (Foster City, CA, EUA).

3.1.7 Materiais diversos

- Cilindro de CO₂, tipo 2,8, White Martins (São Paulo, Brasil).
- Membrana de filtração de 0,22µm, Millipore (Bedford, MA, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta de animais e remoção da glândula hipofisária

Seis *Arapaimas gigas*, machos, entre 100-140 cm de comprimento, foram adquiridos de uma piscicultura de São João da Boa Vista, São Paulo, Brasil. Licença do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) Nº 5198393. Os animais foram sacrificados na piscicultura, sendo em seguida realizada a decapitação e a remoção imediata das glândulas hipofisárias, que foram armazenadas em solução de preservação (*RNA Later*[®] *Solution*) e transportadas para as instalações do IPEN-CNEN/São Paulo para realização dos experimentos.

3.2.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de diferentes hipófises que pesavam aproximadamente (70-100 mg). As glândulas hipofisárias foram colocadas individualmente em cadinhos de porcelana contendo nitrogênio líquido para trituração do material. O RNA total de cada uma das glândulas foi extraído utilizando o *kit* de extração *PureLink Micro-to-Midi Total RNA mini purification kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e posteriormente armazenado na temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento.

3.2.3 Desenho de *primers* consenso e transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase

Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados utilizando o software *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5 (Hall *et al.* 1999). Inicialmente, 13 pares de *primers* para GTH α e nove pares para FSH β (*sense* e *antisense*) foram desenhados com base em regiões conservadas de 17 (GTH α) e 22 (FSH β) sequências de espécies de peixes depositadas no *GenBank* (TAB. 1 e 2), sendo estes utilizados em diferentes reações de PCR até obtenção de uma única banda em gel de agarose. Aproximadamente 0,25 μg de RNA total foi transcrito reversamente em cDNA utilizando o *kit GoScript[®] Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WIS, EUA). Após a adição de Oligo-dT e de *Random Primer*, a solução de reação foi incubada a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Uma mistura contendo ddNTPs, tampões e a enzima *GoScript[®] Reverse Transcriptase* foi adicionada à essa solução e o anelamento foi feito a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. A extensão final ocorreu a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora, seguida de inativação da enzima a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Após a transcrição reversa, o cDNA obtido foi utilizado em diferentes reações de PCR. Na FIG. 5 são descritas as etapas da reação de transcrição reversa.

TABELA 1. Espécies de peixes utilizadas para desenho dos *primers* do GTHa.

Ordem	Nome	Número de acesso
Synbranchiformes	<i>Monopterus albus</i>	JN381163
Perciformes	<i>Sebastes schelegelii</i>	AY609078
	<i>Epinephelus coioides</i>	AF507939
	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	EF605275
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	BK005582
	<i>Solea senegalensis</i>	EF617343
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	AF268692
Cyprinodontiformes	<i>Fundulus heteroclitus</i>	U12923
Salmoniformes	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	S77059
	<i>Oncorhynchus masou</i>	S69273
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AB050834
Cypriniformes	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	X61050
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	GU218060
	<i>Carassius auratus</i>	AY800267
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	AF112190
Anguilliformes	<i>Anguilla marmorata</i>	FJ4900345
Acipenseriformes	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	EU656137

TABELA 2. Espécies de peixes utilizadas para desenho dos *primers* do FSH β .

Ordem	Nome	Número de acesso
Synbranchiformes	<i>Monopterus albus</i>	JN381164
Perciformes	<i>Chrysophrys major</i>	AB020212
	<i>Epinephelus bruneus</i>	EF583919
	<i>Epinephelus coioides</i>	AY679087
	<i>Epinephelus fasciatus</i>	JF520408
	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	AB111457
	<i>Epinephelus merra</i>	AB525770
	<i>Haplochromis burtoni</i>	HQ147566
	<i>Halichoeres trimaculatus</i>	AB641838
	<i>Micropterus salmoides</i>	FJ030932
	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM 003450793
	<i>Thunnus thynnus</i>	EF208026
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i>	DQ402373
	<i>Gadus morhua</i>	HM768313
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	GQ872345
Pleuronectiformes	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	JQ277933
	<i>Solea senegalensis</i>	EF617342
	<i>Solea senegalensis</i>	EU100409
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	XM003969792
	<i>Takifugu niphobles</i>	AB543564
Scorpaeniformes	<i>Sebastes schlegeli</i>	AY609079
	<i>Sebastiscus marmoratus</i>	GU996157

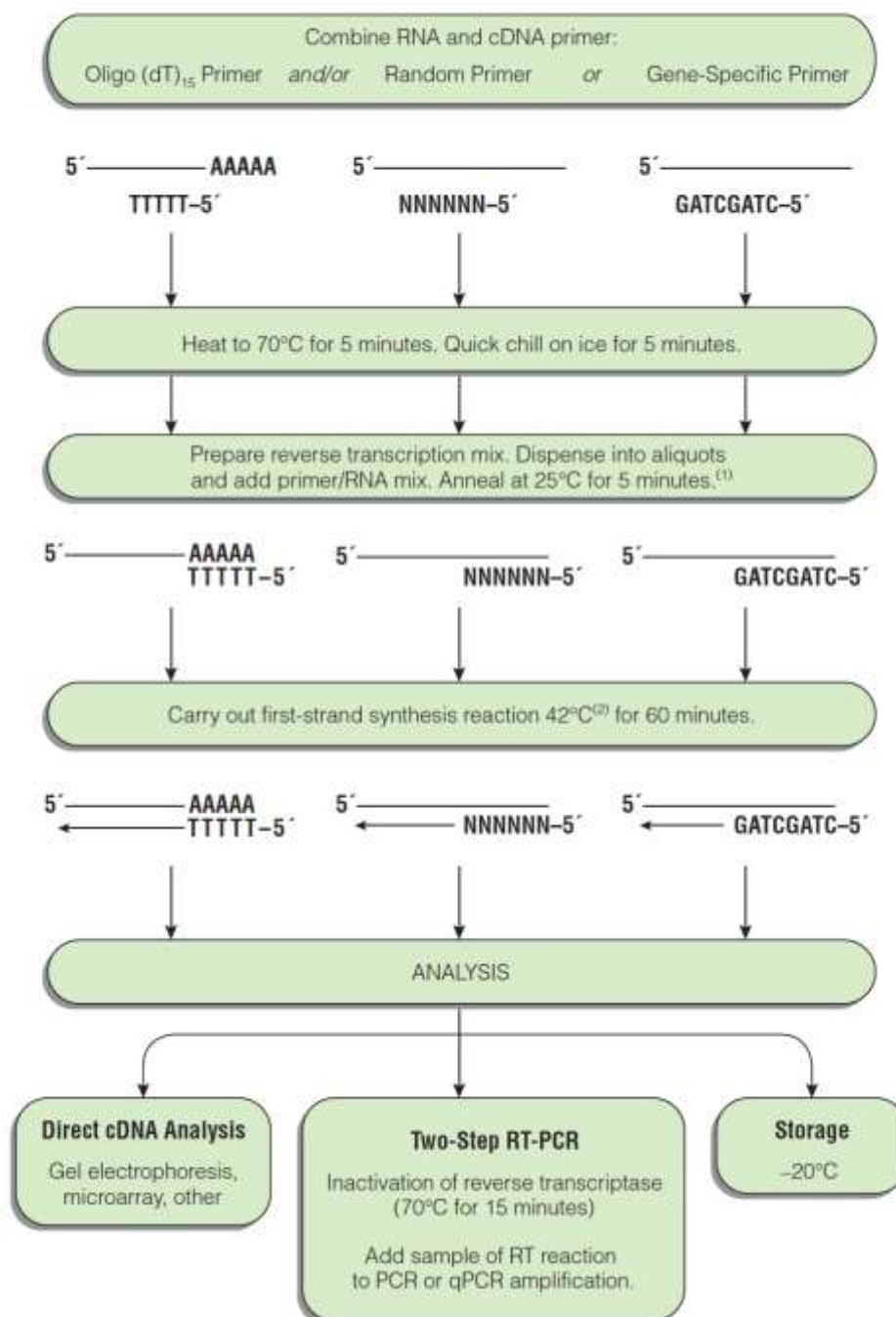


FIGURA 5. Esquema das principais etapas da transcrição reversa. Fonte: protocolo do kit *GoScript™ Reverse Transcription System* da Promega <<http://www.promega.com.br>>.

As reações de PCR para esta etapa foram realizadas em um termociclador Veriti 96-*well* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), utilizando *primers sense* e *antisense* na concentração de 10 mM juntamente com 5 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies). Após denaturação inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos foram programados da seguinte maneira: denaturação a 94 °C por 30s; anelamento por 30 s a 45 °C (GTH α) e 54 °C (FSH β) e extensão a 68 °C por 1min. A elongação final foi feita a 68 °C por 5 min, sendo a reação mantida após esta etapa a 4 °C até análise em gel de agarose.

3.2.4 Amplificação rápida das extremidades finais do cDNA (RACE)

Para a reação de 5'-RACE 0,5-1,0 μ g de RNA total foi reversamente transcrito utilizando 200 U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies) e usando um *primer* específico, de acordo com as instruções do fabricante (FIG. 6). Após digestão da fita de RNA com a enzima RNase H, a fita simples de cDNA proveniente desta etapa foi então purificada mediante utilização de colunas de sílica fornecidas no *kit*, e uma cauda homopolimérica foi adicionada mediante a utilização da enzima desoxinucleotídeo transferase. O PCR foi realizado utilizando o *primer* AAP juntamente com o *primer* específico de ag-GTH α ou ag-FSH β . Após denaturação inicial a 94 °C por 2 min foram programados 35 ciclos da seguinte forma: denaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C (GTH α) e 62,4 °C (FSH β) por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min, seguidos de uma extensão final a 72 °C por 7 min.

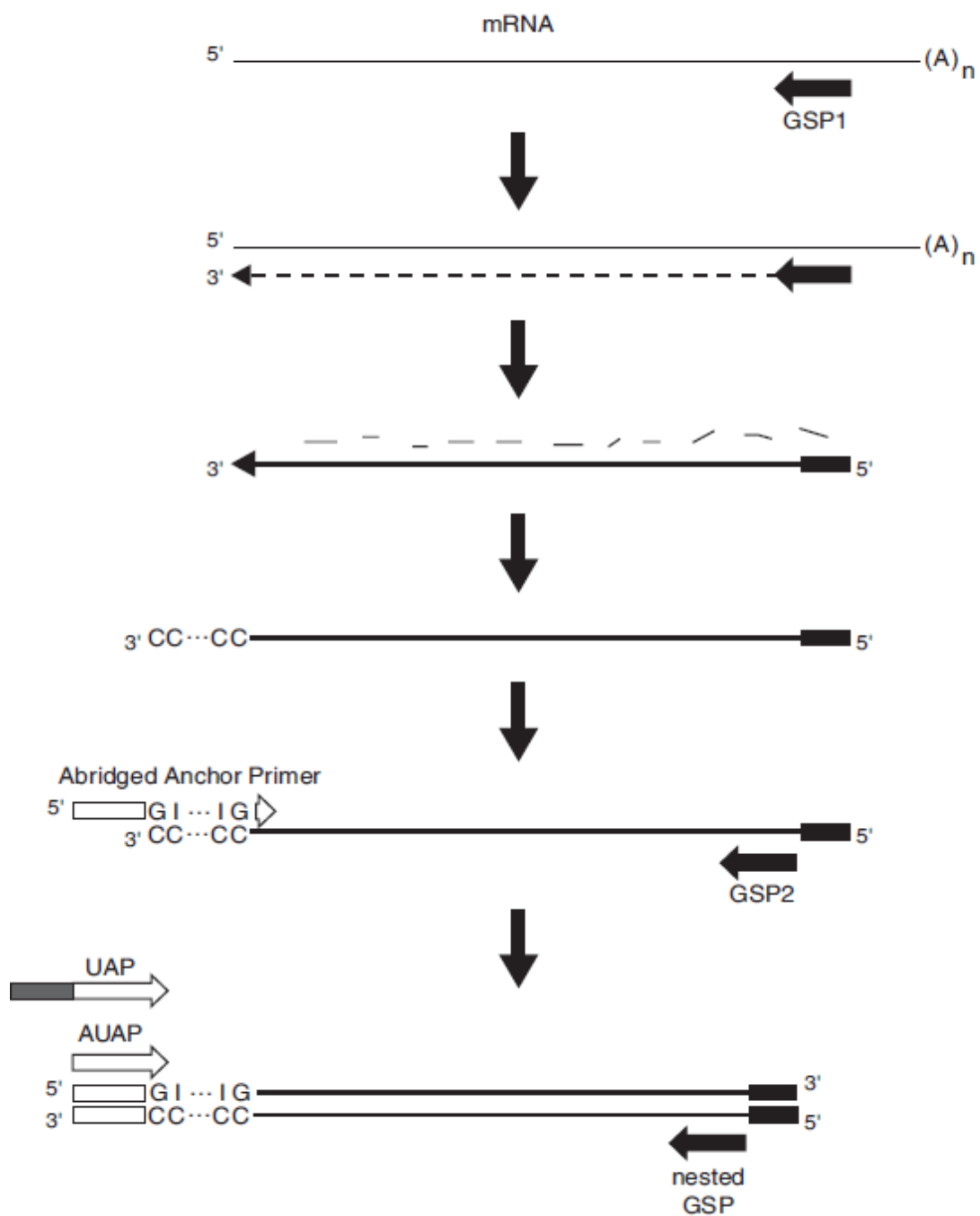


FIGURA 6. Esquema das principais etapas da técnica de 5' RACE. Fonte: protocolo do kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0. <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home.html>>.

Para a reação de 3'-Race, 0,5-1,0 µg de RNA total foi reversamente transcrito utilizando 200 U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies) e um *primer* adaptador . Após denaturação inicial a 94 °C por 3 min, o PCR foi realizado utilizando um *primer* específico, *sense*, juntamente com o *primer* do kit AUAP (*antisense*). Foram programados 35 ciclos da seguinte maneira: denaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C (GTHα) e 63 °C (FSHβ) por 30 s e extensão a 68 °C por 1 min. A extensão final foi realizada a 68 °C por 5 min.

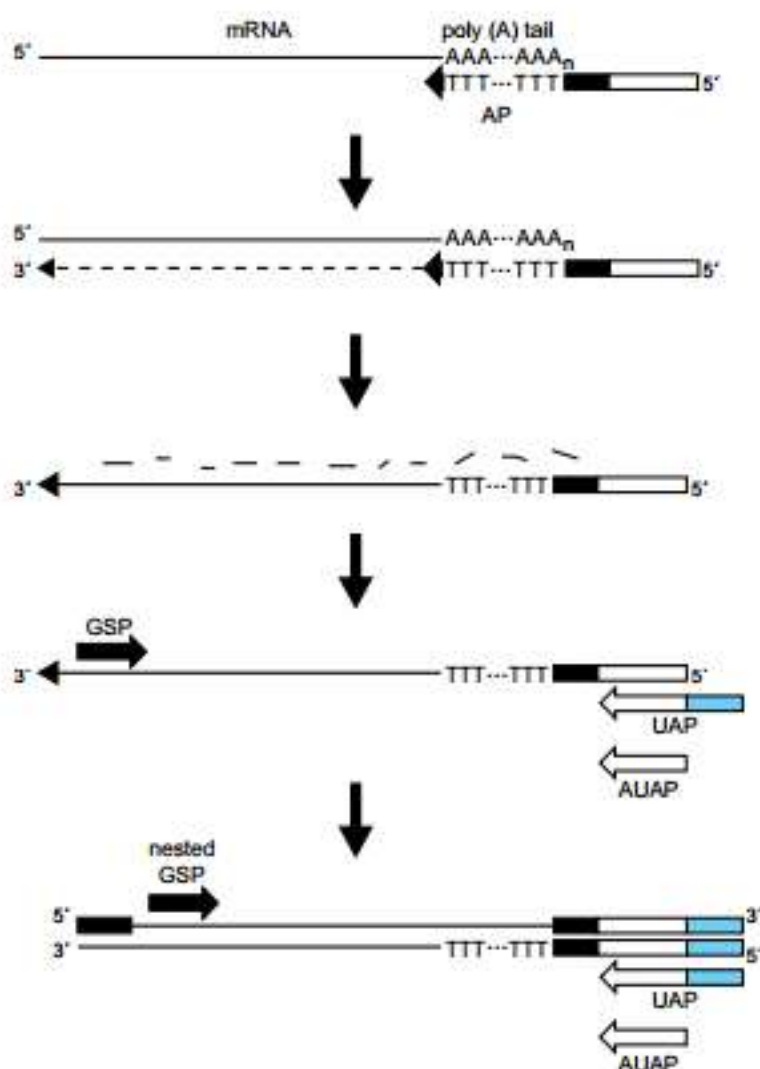


FIGURA 7. Esquema das principais etapas da técnica 3' RACE. Fonte: protocolo do kit 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home.html>>.

A confirmação da sequência total de ag-GTH α ou ag-FSH β foi feita em pelo menos três glândulas hipofisárias diferentes. Um *primer* específico foi utilizado juntamente com o *primer* AUAP, *antisense*, em outra reação de PCR, mediante a utilização da primeira fita simples de cDNA obtida pela técnica de 3'-RACE, com uso das mesmas condições já descritas no tópico "3.2.4, 3' RACE", exceto a temperatura de anelamento, que para o GTH α foi de 60 °C, enquanto que para o FSH β foi de 65 °C.

3.2.5 Análise por gel de agarose

Para análise de todas as amostras de ácidos nucleicos, foi utilizado gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (1mg/mL). A agarose foi dissolvida em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e aquecida em forno micro-ondas. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o brometo de etídio foi adicionado à solução, e esta foi colocada em cuba de eletroforese, para polimerização. As amostras foram aplicadas em poços individuais e submetidas à corrente elétrica de 60 volts e 45 mA, por uma hora, sendo posteriormente visualizadas em luz ultravioleta (UV).

3.2.6 Purificação enzimática dos produtos das reações de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando o reagente *ExoSap-IT* (Affymetrix, Cleveland, Ohio, EUA), adicionando-se 2 μ l do reagente a 5 μ L do produto de PCR. Foi feita uma incubação inicial de 37 °C por 15 min, seguida de inativação a 80 °C por 15 min.

3.2.7 Extração do produto de PCR do gel de agarose

Os fragmentos de interesse foram recortados do gel de agarose, pesados e, de acordo com as instruções do *kit*, foi adicionada uma quantidade suficiente de tampão 1 (fornecido pelo fabricante), sendo as amostras aquecidas, separadamente, a 50 °C por 10 min. Após esta etapa as soluções obtidas foram aplicadas em colunas de sílica e centrifugadas a 12.000 x g por 60 segundos. Foram realizadas duas etapas de lavagem e em seguida a amostra foi eluída com água ultrapura obtendo-se um volume final de 50 μ L.

3.2.8 Quantificação dos ácidos nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop, equipado com lâmpada de xenônio, adicionando-se ao pedestal do equipamento 1 μ L de amostra de PCR. Esta foi então lida nos comprimentos de onda de 260 e de 280 nm, calculando a razão de absorvância para os dois comprimentos de onda, para confirmação da pureza do DNA ou RNA.

3.2.9 Sequenciamento do cDNA obtido

O sequenciamento do cDNA do GTH α foi realizado adicionando-se aproximadamente 200 ng da reação de PCR previamente purificada, juntamente com o respectivo *primer* na concentração 5 mM, totalizando um volume final de 7,5 μ L. A reação foi enviada para o Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) e o cDNA foi sequenciado mediante utilização do MegaBace 1000, sistema de análise de DNA de 96 capilares, com tecnologia GE Healthcare. Para o sequenciamento do ag-FSH β , a reação foi preparada em nosso laboratório utilizando-se o *Kit Big Dye v 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). Aproximadamente 200 ng de cDNA, 1 μ L de *primer* 10 mM, 3 μ L de tampão de sequenciamento (Tris-HCL 200 mM, pH 9,0; MgCl₂ 5 mM), foram adicionados a um tubo de reação com água obtendo-se volume final de 15 μ L. O programa de termociclagem foi realizado com denaturação inicial de 96 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos com: denaturação a 96 °C por 45 s, anelamento a 58 °C por 30 s e extensão de 60 °C por 4 min. Após a PCR, as amostras foram preparadas para o sequenciamento, adicionando a cada uma 25 μ L da solução *coktail* de precipitação (etanol 100% (v/v); acetato de sódio 3M pH 5,2 e glicogênio 1mg/mL). Agitou-se em vortex, sendo as soluções mantidas a -20 °C por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida foi realizada uma centrifugação (4.000 rpm por 30 min), sendo o sobrenadante descartado por inversão dos tubos. Nesta fase, foram adicionados 50 μ L de etanol 70% (v/v), sendo as soluções, novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado como descrito na etapa anterior. Finalmente, as amostras foram aquecidas a 96 °C por 3 min, e subsequentemente acondicionadas a -20 °C em recipientes protegidos

com papel alumínio e ao abrigo da luz, até envio para sequenciamento no Instituto de Química (USP, SP, Brasil), onde o sequenciamento do cDNA foi realizado utilizando o sistema ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser.

3.2.10 Introdução das subunidades α e β em vetores de expressão dicistrônicos

3.2.10.1 Obtenção das regiões codificadoras de ag-GTH α e de ag-FSH β com os sítios de restrição necessários

Foram sintetizados oligonucleotídeos com prévia incorporação de sítios de restrição às suas extremidades 5' ou 3' e específicos para cada um dos vetores. Para o ag-GTH α foram utilizados os sítios *Xba*I (*Primer sense*) e *Eco*RI (*primer antisense*), enquanto que para o ag-FSH β foram utilizados os sítios *Sma*I (*primer sense*) e *Eco*RI (*primer antisense*) (TAB. 3).

TABELA 3. Sítios de restrição e oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região codificadora do GTH α ou FSH β de *A. gigas*. Os sítios de restrição estão indicados em vermelho.

Enzima	Subunidade	Oligonucleotídeo
<i>Xba</i> I	GTH α <i>sense</i>	5' GCT CTA GAA TGA GCT ACA CAG GAA AAC 3'
<i>Eco</i> RI	GTH α <i>antisense</i>	5' GGA ATT CTT ATG ACT TGT GAT AGT AGC AGG 3'
<i>Sma</i> I	FSH β <i>sense</i>	5' TCC CCC GGG ATG ACC TGT ATG CTG CTG CT 3'
<i>Eco</i> RI	FSH β <i>antisense</i>	5' CGG AAT TCC TAG TGC CCC TGA CAG CCT 3'

Foi então realizada a amplificação por PCR, apenas da região codificadora do ag-GTH α e do ag-FSH β , com introdução dos respectivos sítios de restrição presentes nestes oligonucleotídeos, utilizando como molde a fita simples de cDNA obtida anteriormente pela técnica de 3' RACE.

O PCR foi programado com uma denaturação inicial de 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de: denaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C (GTH α) e a 65 °C (FSH β) por 30 s e extensão a 68 °C por 1 min. A extensão final foi realizada a 68 °C por 5 min.

Após esta etapa os *primers* e ddNTPs remanescentes na solução foram degradados enzimaticamente e aproximadamente 200 ng de cDNA foram digeridos com suas respectivas enzimas: incubando a 37 °C por 10 min e inativando a 65 °C por 10 min.

3.2.10.2 Preparo dos vetores de expressão

Aproximadamente 1 μ g do vetor de expressão pEDdc foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI, em uma reação de dupla digestão com incubação a 37 °C por 10 min, seguida de inativação a 65 °C por 10 min. O vetor pEAdc foi digerido nas mesmas condições, porém com a utilização das enzimas *Sma*I e *Eco*RI.

3.2.10.3 Ligação dos fragmentos de ag-GTH α e de ag-FSH β nos vetores de expressão

A reação de ligação foi feita na proporção 3:1 de vetor/inserto, sendo que aproximadamente 107 ng de vetor (pEDdc) foram incubados juntamente com aproximadamente 35 ng de inserto (ag-GTH α) a 22 °C por 20 min, realizando a inativação da ligase a 65 °C por 15 min.

Para o vetor pEAdc foi utilizada a mesma estratégia, com a utilização de aproximadamente 123 ng de vetor (pEAdc) juntamente com 40 ng de inserto (ag-FSH β).

3.2.10.4 Transformação de bactérias competentes (*E. coli* DH5 α) com os vetores de expressão dicistrônicos

Os produtos das reações contendo os vetores previamente preparados, foram utilizados para transformar bactérias competentes (*E. coli* cepa DH5 α) utilizando o método do choque térmico. Todo o volume proveniente da reação de ligação foi adicionado a 200 μ L de bactérias competentes (4×10^8 céls/mL), mantendo no gelo por 20 min. Após este passo, os produtos foram transferidos para banho maria e incubados a 37 °C por 2 min. Foram então adicionados 800 μ L de meio Luria-Bertani (LB) sem antibiótico, em condições de esterilidade, incubando a 37 °C com agitação de 50 rpm em *shaker*, por uma hora. Finalmente, volumes de 100 e 200 μ L do produto obtido foram semeados em placas de Petri contendo meio (LB) suplementado com ampicilina (0,1 mg/mL), e incubando *overnight* (aproximadamente 16h) a 37 °C.

3.2.10.5 Seleção de colônias e detecção de clones positivos para cada um dos vetores de expressão

Com base nos experimentos realizados anteriormente, foram selecionadas aleatoriamente 10 colônias de cada placa, que foram incubadas a 37 °C *overnight* em tubos falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio LB suplementado com ampicilina (0,1 mg/mL), com agitação de 150 rpm. No dia seguinte, foi removida uma alíquota individual de cada colônia para uso em reações de PCR.

Os PCRs foram realizados utilizando os mesmos parâmetros já descritos para amplificação das regiões codificadoras do ag-GTH α e do ag-FSH β “tópico 3.2.10.1”.

3.2.10.6 Midi preparação do DNA plasmidial relativo aos dois vetores de expressão

Foram preparados 150 mL de meio (LB) suplementado com ampicilina (0,1 mg/mL) para inoculação de uma colônia positiva para cada um dos dois vetores, sendo as misturas mantidas a 37 °C *overnight* com agitação de 150 rpm. Após esta etapa, centrifugou-se a 6.000 rpm por 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado. A extração de DNA plasmidial foi feita utilizando o *kit* apropriado (Macherey-nagel GmbH & CO. KG), conforme as instruções do fabricante. Finalmente, o DNA obtido nesta reação foi sequenciado a fim de verificar a correta orientação dos insertos nos vetores utilizando os mesmos parâmetros já descritos “tópico 3.2.9”.

3.2.11 Cultivo Celular

O processo de cultivo de células CHO DHFR⁻, linhagem DXB11 foi realizado em placas de 10 cm de diâmetro com um inóculo inicial de $1,0 \times 10^6$ células/placa. Durante a fase de crescimento celular, as células foram mantidas em 10 mL de meio α -MEM com nucleosídeos, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Quando as células atingiram cerca de 80% de confluência, o que aconteceu em aproximadamente três dias, foi dado início ao procedimento de transfecção com os vetores de expressão previamente preparados, como já descrito anteriormente.

3.2.12 Transfecção de células CHO DHFR⁻ com os vetores de expressão

Células CHO DHFR⁻ linhagem DXB11 foram co-transfectadas pelo método dos lipossomos, sendo que a transfecção foi feita na proporção de DNA α : β 1:5. Foi então preparada uma solução de 2 μ g do vetor pEDdc-ag-GTH α juntamente com 10 μ g do vetor pEAdc-ag-FSH β , em 800 μ L de meio α -MEM, com nucleosídeos, sem soro. Paralelamente, foi feita uma diluição de 40 μ L de

lipofectamina 2mg/mL (Invitrogen[®]), em 800 μ L de meio α -MEM com nucleosídeos e sem soro.

As duas soluções foram então misturadas obtendo um total de 1,6 mL e incubadas a temperatura ambiente por 45 min. Após esta etapa, foram adicionadas à mistura 1,6 mL de meio sem soro. Esse volume total de 3,2 mL de solução foi transferido para uma placa de cultura após remoção do meio de cultivo. Após incubação de 5-6h a 37 °C, em atmosfera de CO₂ (5%), foram adicionados à placa 6,4 mL de meio suplementado com 20% de SFB. Após 48h de incubação, procedeu-se à seleção de transformantes DHFR⁺.

3.2.13 Seleção e amplificação

A seleção dos transformantes DHFR⁺ foi realizada em meio seletivo α -MEM, na ausência de nucleosídeos, e suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado (SFBd).

A etapa de amplificação gênica se deu através da adição de concentrações crescentes de metotrexato (MTX) ao meio de cultivo. Como ponto de partida, as concentrações iniciais utilizadas foram as seguintes: 30, 60, 120 e 300 nM, até o presente momento. Foi realizado um teste imunoenzimático (ELISA) utilizando o sistema DS-EIA-Gonadotrofina-FSH, a fim de detectar a presença de ag-FSH no meio de cultura condicionado.

3.2.14 Detecção por PCR do cDNA de ag-GTH α e de ag-FSH β durante amplificação gênica

A detecção do cDNA de ag-GTH α e de ag-FSH β durante o processo de amplificação gênica em culturas de células foi feita por PCR. O protocolo utilizado foi o mesmo empregado na amplificação das regiões codificadoras de cada subunidade. “Ver tópico 3.2.10.1”.

3.2.15 Análise Filogenética

Para a análise filogenética, as sequências de aminoácidos do peptídeo maduro foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE (Edgar *et al.* 2004) com outras sequências de peixes retiradas do *GenBank* (37 para GTH α e 40 para FSH β). Utilizando o *software* MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) baseado no método de *Neighbor-Joining*, uma árvore filogenética foi gerada para cada subunidade, utilizando para enraizamento três espécies de Acipenseriformes (como grupo externo), com um suporte filogenético derivado de 1000 réplicas.

O alinhamento e o cálculo das identidades entre as sequências alinhadas foi feito pelo *software* *Geneious* 5.5.6 e a busca pelo melhor modelo de árvore filogenética pelo *software* MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Todas as posições contendo lacunas ou dados faltantes foram eliminadas das análises.

As sequências de cDNA de ambas as subunidades beta (FSH e LH) foram concatenadas para gerar outra árvore filogenética baseada nos métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança, aplicando o modelo HKY (Hasegawa *et al.* 1985), com parâmetro Gamma= 1.34. O suporte filogenético foi obtido pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) utilizando 1000 réplicas, sendo que em todas as análises foram alocadas como grupo externo, três espécies de Acipenseriformes.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e análise do cDNA da subunidade alfa das gonadotrofinas (GTH) de *Arapaima gigas* (pirarucu)

4.1.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de hipófises individuais na presença de nitrogênio líquido. É possível observar na FIGURA 8 a qualidade do material obtido devido à presença de duas bandas íntegras relativas ao RNA ribossomal.

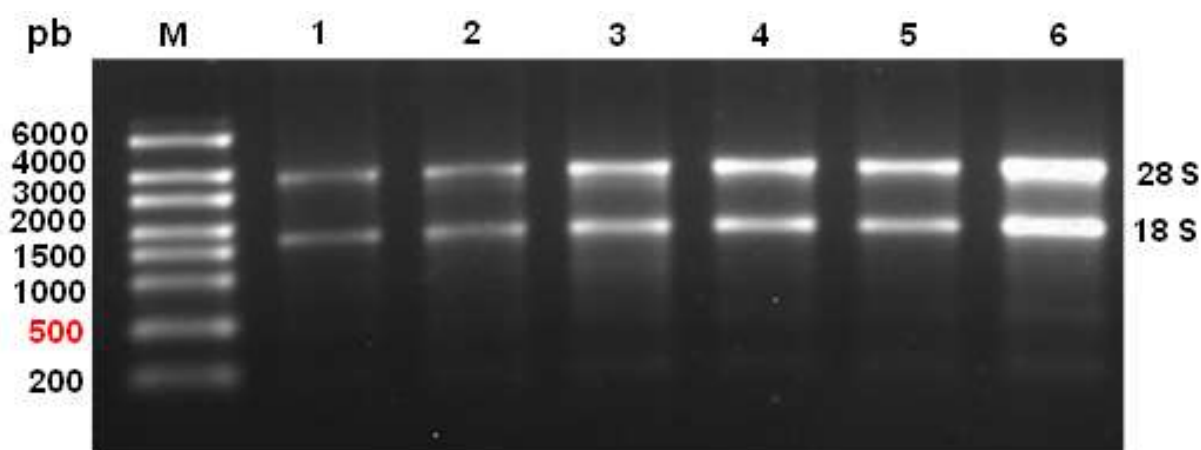


FIGURA 8. Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. O primeiro poço representa o marcador de peso molecular e os demais poços as bandas 28s e 18s do RNA ribossomal de seis hipófises diferentes de *A. gigas*.

4.1.2 RT-PCR e desenho de *primers* consenso com identificação de uma primeira sequência parcial de GTH α .

Com base em 17 sequências de cDNA de GTH α de diferentes espécies de peixes depositadas no *GenBank*, altamente conservadas e geneticamente mais relacionadas ao *A. gigas*, foram desenhados 13 pares de *primers* consenso que permitissem identificar regiões específicas do gene a partir do RNA total

transcrito para cDNA, mediante transcriptase reversa (*kit SuperScript® III One-Step, Invitrogen*).

Após várias tentativas, um par de *primers* (#1 e #2, TAB. 4) chegou a transcrever uma única banda, identificada em gel de agarose 1,2% (FIG. 9). Seu sequenciamento indicou que a banda obtida correspondia a uma sequência parcial específica de GTH α de *A. gigas*, localizada na região central do gene.

TABELA 4. *Primers* utilizados na clonagem das subunidades do GTH α e do FSH β de *A. gigas*.

Número	Direção	Nome	Sequência
<i>Primer 1</i>	<i>Sense</i>	GTH α Consenso 1	5' CAT GGG CTG CTG CTT CTC 3'
<i>Primer 2</i>	<i>Antisense</i>	GTH α Consenso 2	5' CTC TTT GGT ATG TCT GAC G 3'
<i>Primer 3</i>	<i>Sense</i>	FSH β Consenso 1	5' ATG CAG CTG GTT GTC ATG GCA 3'
<i>Primer 4</i>	<i>Antisense</i>	FSH β Consenso 2	5' TCT GGC CAC AGG GTA GGT GA 3'
<i>Primer 5</i>	<i>Antisense 5' RACE</i>	agGTH α -1	5' TTT GCT GTT CTG CCT TA 3'
<i>Primer 6</i>	<i>Antisense 5' RACE</i>	agGTH α -2	5' CTT GTG ATA GTA GCA GGT GTT G 3'
<i>Primer 7</i>	<i>Sense 5' RACE</i>	AAP	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG 3'
<i>Primer 8</i>	<i>Sense 5' RACE</i> ou <i>Antisense 3' RACE</i>	AUAP	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'
<i>Primer 9</i>	<i>Antisense 3' RACE</i>	AP	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T 3'
<i>Primer 10</i>	<i>Sense 3' RACE</i>	agGTH α -3	5' CAT GGG CTG CTG CTT CTC 3'
<i>Primer 11</i>	<i>Antisense 5' RACE</i>	agFSH β -3	5' ACA GGG TAG GTG AAA T 3'
<i>Primer 12</i>	<i>Antisense 5' RACE</i>	agFSH β -4	5' GGG TCC ACT CCT TCA GGG 3'
<i>Primer 13</i>	<i>Sense 3' RACE</i>	agFSH β -5	5' CCC TGA AGG AGT GGA CCC 3'
<i>Primer 14</i>	<i>Sense</i>	agFSH β -5'UTR	5' GCT GGT AGG AGT CCA ACA 3'

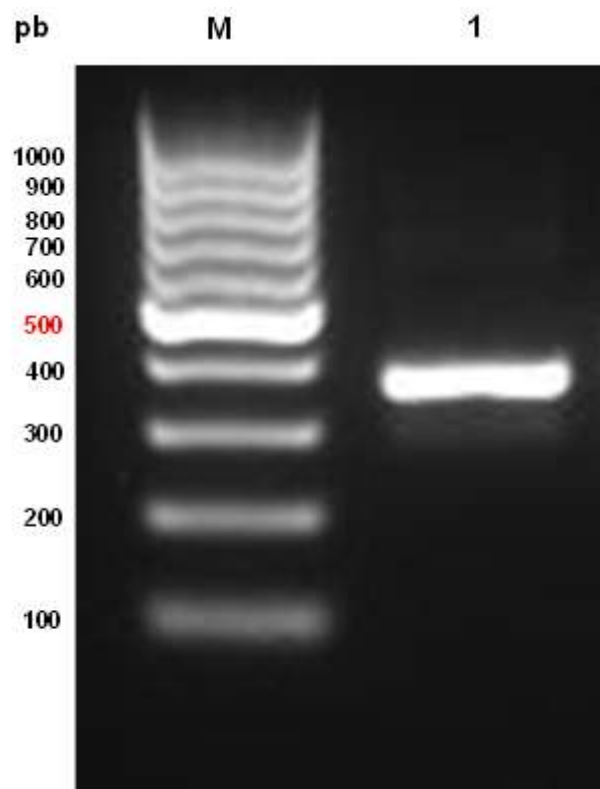


FIGURA 9. Banda de aproximadamente 400 pb relativa à primeira região parcial identificada no cDNA de ag-GTH α , juntamente com o marcador de peso molecular (1Kb).

4.1.3 Amplificação rápida das extremidades finais de cDNA (RACE) para o sequenciamento da subunidade ag-GTH α .

Foram utilizados os *kits* específicos da Life Technologies para amplificação rápida dos terminais 5' e 3' do cDNA em análise.

5'-RACE. Usando um *primer* específico *antisense* (#5) desenhado com base na sequência já obtida no tópico anterior, foi obtido um cDNA de fita simples que copiou toda a região 5' do gene. Em seguida, utilizando outro *primer* específico *antisense* (#6), juntamente com dois *primers* do *kit sense* (#7 e #8) localizados na região 5', foi obtida, após diversas etapas, uma sequência específica que inclui toda a extremidade 5' do gene.

3'-RACE. Neste caso, usando um *primer* do *kit antisense* (#9), ligado à cauda poly-A, foram obtidas todas as fitas simples de cDNA derivadas do RNA

mensageiro em análise. Em seguida, usando o *primer* específico *sense* #10 (desenhado com base na sequência já identificada e descrita no tópico anterior) e o mesmo *primer* #8 do kit desta vez usado na modalidade *antisense*, foi obtida uma banda correspondente à região 3' do gene.

4.1.4 Confirmação da sequência de cDNA de GTH α

A confirmação da sequência do cDNA de GTH α foi realizada em 6 hipófises diferentes, analisando diferentes regiões do gene, o que levou a uma sequência total de exatamente 767 bp, incluindo uma cadeia final de 20 A (poly-A). Foi, portanto, identificada uma proteína de 115 aminoácidos, incluindo um suposto peptídeo sinalizador de 24 aminoácidos, determinado pelo *software* SignalP 4.1 (Petersen *et al.* 2011). Na FIG. 10 é apresentada a sequência completa de aminoácidos e nucleotídeos relativa ao cDNA de ag-GTH α .

Ressaltamos que a sequência completa de cDNA ag-GTH α foi depositada no *GenBank* sob o código de acesso KJ755358 e já está disponível para consulta.

```

1 tgaacagctcactacaaaagtacagaaacctcccgtcactacgtattttgcaggcaccatg 60
   M
61 agctacacaggaaaactgaccattgcatctgtttctggcattactggccatcttacatatt 120
   S Y T G K L T I A S V L A L L A I L H I
121 gtagactctaatttcaatgtgggttgtgaagagtgcaaacttaaggagaacaagtacttc 180
   V D S N F N V G C E E C K L K E N K Y F
181 tcaaggctgggagcaccatctttcagtgcatgggctggttgccttccagagcataacct 240
   S R L G A P I F Q C M G C C F S R A Y P
241 acacctctgaggtccaagaaaacaatgctggttccaagaacataacatccgaggcaacg 300
   T P L R S K K T M L V P K N I T S E A T
301 tgctgtgggctaaagaagtcaaacggctgatcacactgaacaacgtgagactggaaaaac 360
   C C V A K E V K R L I T L N N V R L E N
361 cacacggactgtcactgcaacacctgctactatcacaagtcataaggcagaacagcaaaa 420
   H T D C H C N T C Y Y H K S -
421 ctttatttaacctgatttgaaggtagattaaaaaatgacattggttgatttaattgtcat 480
481 tgtttttcatttcatagacgtaacatgctgaagactcattagactatacaaggaaaactg 540
541 tgtgatgtgtaaatcttttgtgtagaaaaaagttctgaatagctcatcatatctttaa 600
601 tttttgttcatttacataaaacagtactcaciaaagcaattaaagcgggaatcattagag 660
661 gcaatcttcagctggaaaattgtattgcattttgtcagtaccaacacaagctttcattta 720
721 cttattaaaagagccacataaaacatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 767

```

FIGURA 10. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos de ag-GTH α . M, metionina inicial; NIT e NHT, sítios de glicosilação; N, primeiro aminoácido do peptídeo maduro; C, cisteínas; p, prolinas; TAA, *stop codon*; attaaa, sinal de poliadenilação; aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (n=20), cauda de poly (A).

4.1.5 Alinhamento das sequências de aminoácidos do GTH α de diferentes espécies

Na FIG. 11 podemos observar o alinhamento das sequências de aminoácidos do peptídeo maduro do GTH α de *A. gigas*, juntamente com aquelas de outras 34 espécies de teleósteos e de três Acipenseriformes. Ressaltamos a presença altamente conservada dos dois sítios de glicosilação (NIT e NHT), de 10 cisteínas que permitirão a formação de cinco pontes dissulfeto e de três prolinas que estão relacionadas com a direção do esqueleto estrutural da proteína.

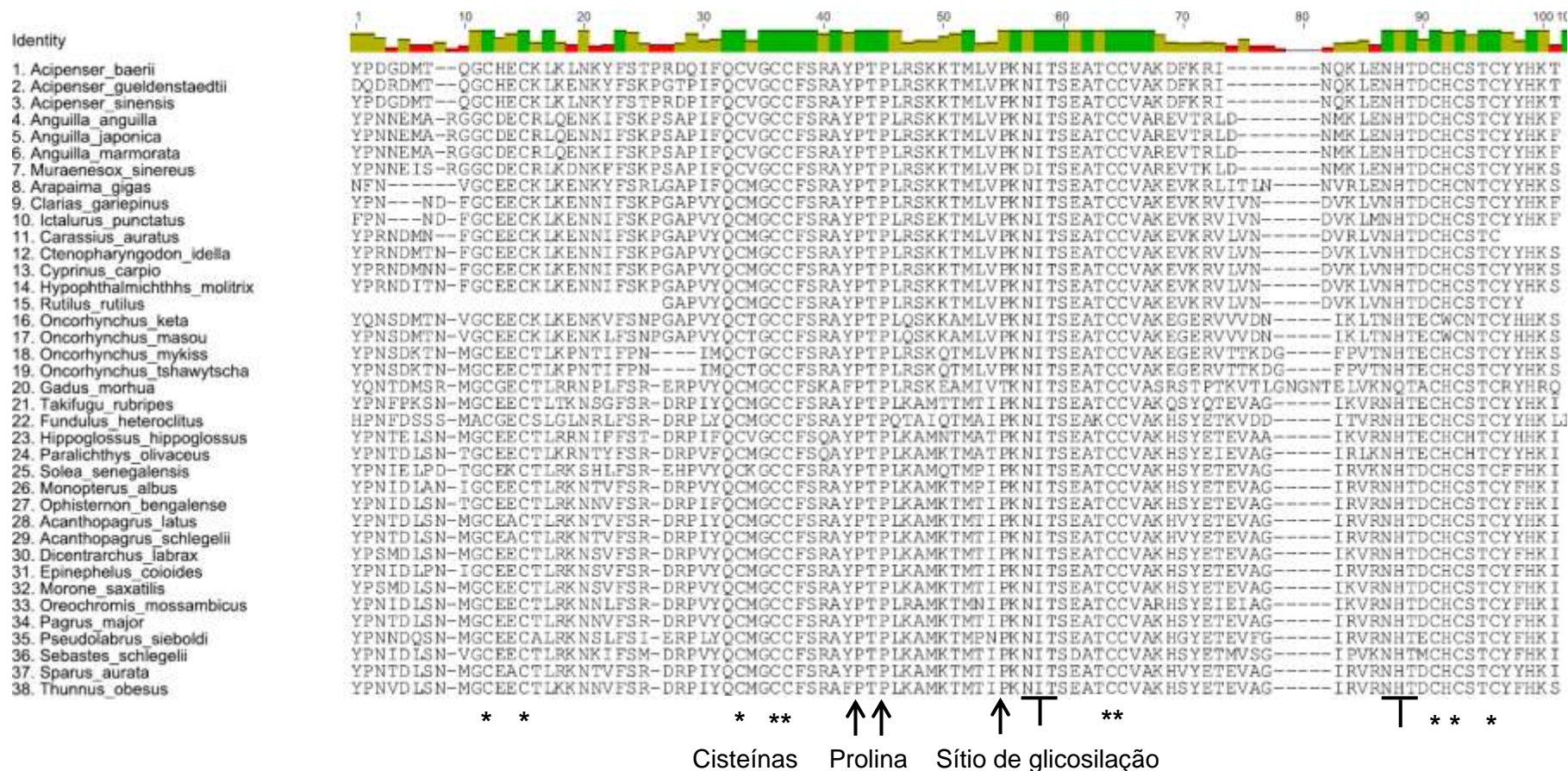


FIGURA 11. Alinhamento de seqüências de aminoácidos de 37 espécies de peixes retiradas do *GenBank*, juntamente com a seqüência encontrada de GTH α de *A. gigas*.

4.1.6 Nível de identidade entre sequências de aminoácidos de ag-GTH α em diferentes ordens de peixes

A TAB. 5 apresenta as porcentagens de identidade relativa a subunidades de GTH α que relacionam a ordem Osteoglossiforme com outras 11 ordens de peixes. Podemos observar que o maior nível de identidade existe com os Cypriniformes (ex. carpas), os Anguilliformes e Siluriformes e os Acipenseriformes (ex. esturjão), enquanto que o menor é representado pelos Cyprinodontiformes (ex. killfish) e Gadiformes (ex. bacalhau).

TABELA 5. Percentual de identidade de peptídeos maduros de GTH α em diferentes ordens de peixes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1 Osteoglossiformes (1) ^a	100	87.1	88.1	89.5	88.1	75.7	67.4	55.0	55.0	70.0	63.6	62.8	
2 Acipenseriformes (3) ^a		100	88.1	84.8	84.1	74.6	66.2	55.0	55.0	67.7	64.5	65.3	
3 Anguilliformes (4) ^a			100	98.2	83.7	83.1	73.5	64.0	51.6	57.0	64.7	60.5	62.2
4 Cypriniformes (5) ^a				100	99.3	97.9	79.8	71.9	60.3	62.8	70.5	63.7	67.2
5 Siluriformes (2) ^a					100	96.5	79.0	71.7	60.3	61.6	70.0	63.6	67.7
6 Salmoniformes (4) ^a						100	87.4	63.0	58.9	56.4	62.2	61.1	65.3
7 Perciformes (11) ^a							100	93.3	81.6	58.4	94.4	83.6	88.2
8 Cyprinodontiformes (1) ^a								100	52.3	82.1	76.8	81.1	
9 Gadiformes (1) ^a									100	57.7	54.0	57.7	
10 Synbranchiformes (2) ^a										100	94.7	86.0	88.1
11 Pleuronectiformes (3) ^a											100	82.4	80.3
12 Tetraodontiformes (1) ^a												100	

^aOs números em parênteses representam o número de espécies analisadas em cada ordem.

4.1.7 Árvore filogenética construída comparando o peptídeo de ag-GTH α com aqueles de outras 37 espécies de peixes

A árvore filogenética construída utilizando três espécies de Acipenseriformes como grupo externo e comparando o ag-GTH α com outras 34 espécies de teleósteos está apresentada na Figura 12.

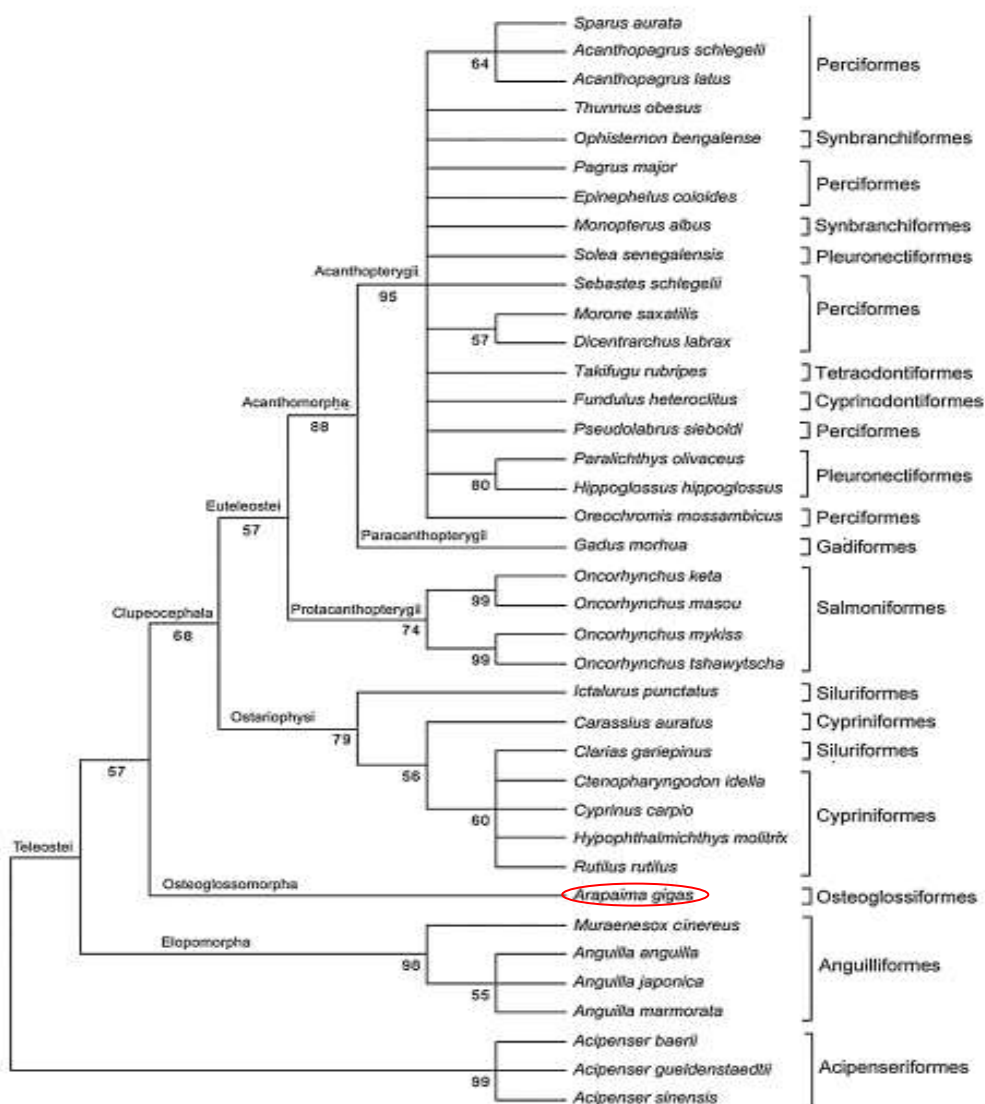


FIGURA 12. Árvore filogenética obtida pelo método de *neighbour joining*, relativa a peptídeos maduros de ag-GTH α , utilizando 12 ordens e 38 espécies de peixes, sendo que três Acipenseriformes foram usados como grupo externo para enraizar a árvore. Os valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados abaixo dos ramos.

Todos os dados relativos ao sequenciamento, caracterização e filogenia do cDNA de ag-GTH α foram publicados na revista especializada *Fish Physiology and Biochemistry* (Faria *et al.* 2013).

4.2 Isolamento e análise do cDNA da subunidade beta do hormônio folículo estimulante (FSH) de *Arapaima gigas* (pirarucu)

4.2.1 RT-PCR e desenho de *primers* consenso com identificação de uma primeira sequência parcial de FSH β .

Com base em 22 sequências de FSH β de diferentes espécies de peixes depositadas no *GenBank*, altamente conservadas e geneticamente mais relacionadas ao *A. gigas*, foram desenhados nove pares de *primers* consenso que permitissem identificar regiões específicas do gene a partir do RNA total, transcrito para cDNA mediante *transcriptase reversa* (*kit GoScript* da Promega).

Após várias tentativas, um par de *primers* (#3 e #4, TAB. 1) chegou a amplificar três bandas identificadas em gel de agarose 1,2% (FIG.13). Seu sequenciamento após amplificação por PCR, indicou que a banda mais fraca (aproximadamente 300 pb), extraída do gel de agarose e reamplificada FIG.14, era específica para uma sequência parcial do cDNA do FSH β de *A. gigas*, localizada na região central do gene.

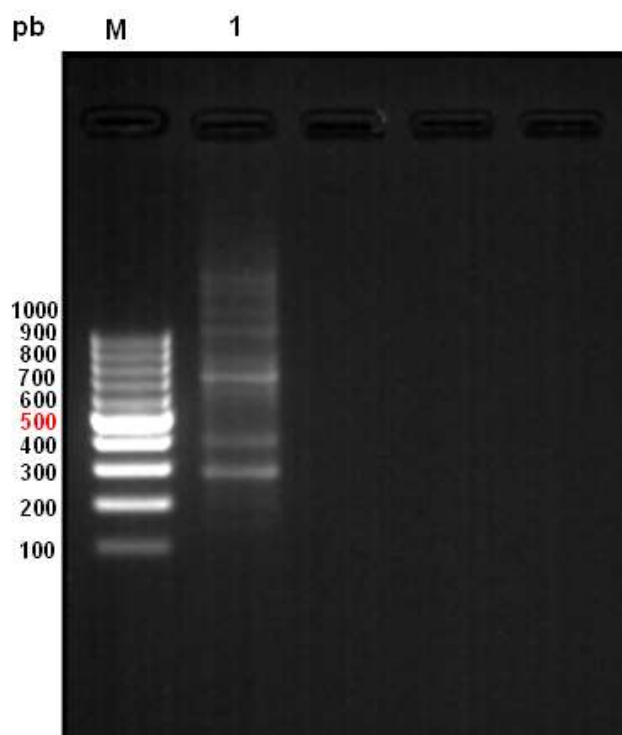


FIGURA 13. Bandas obtidas mediante uso de *primers* consenso desenhados para identificar uma primeira sequência do gene do FSH β .

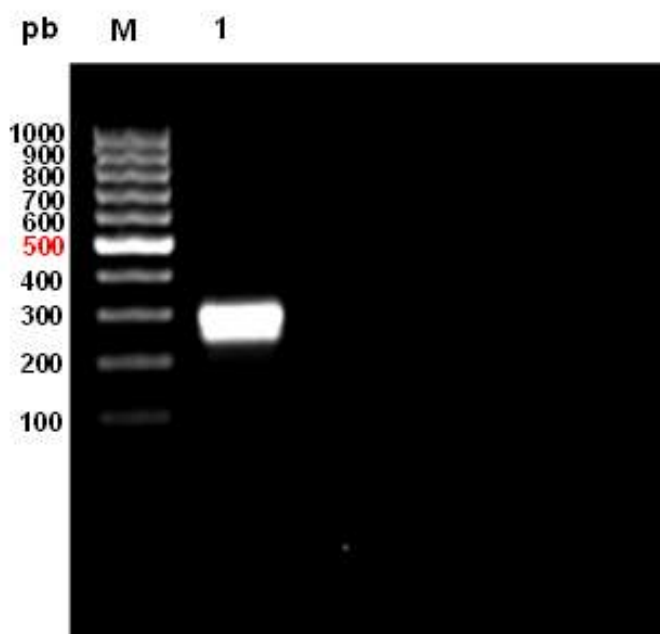


FIGURA 14. Banda de 300 pb extraída do gel de agarose anterior e reamplificada, relativa à uma sequência parcial de cDNA de ag-FSH β .

A região assim identificada no gene de ag-FSH β permitiu desenhar os *primers* específicos que foram usados subsequentemente.

4.2.2 Amplificação rápida das extremidades finais de cDNA (RACE) para o sequenciamento da subunidade ag-FSH β .

Foram utilizados os *kits* específicos da Life Technologies para amplificação rápida dos terminais 5' e 3' do cDNA em análise.

5'-RACE. Usando um *primer* específico *antisense* (#11) desenhado com base na sequência já descrita anteriormente, foi obtido um cDNA de fita simples que copiou toda a região 5' do gene. Utilizando, agora, outro *primer* específico *antisense* (#12), juntamente com dois *primers* do *kit sense* (#7 e #8), localizados na região 5', foi obtida, após diversas etapas, uma sequência específica de aproximadamente 400 bp que inclui toda a extremidade 5' do gene (FIG 15).

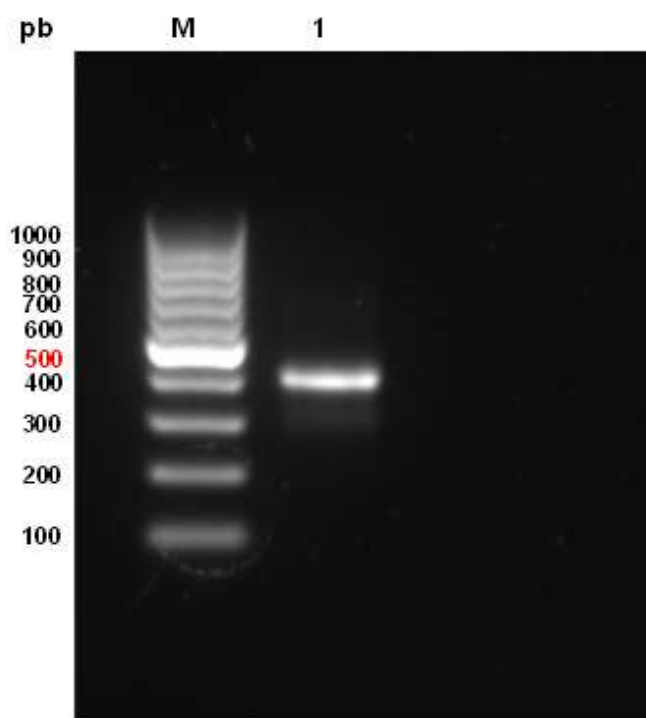


FIGURA 15. Banda relativa à sequência 5' UTR do cDNA de ag-FSH β .

3'-RACE. Neste caso, usando um *primer antisense* (#9) do *kit*, ligado à cauda poly-A, foram obtidas todas as fitas simples de cDNA derivadas do RNA total analisado. Em seguida, usando o *primer específico sense* #13, desenhado com base na sequência já identificada e descrita anteriormente, e o mesmo *primer* #8 do *kit*, desta vez usado na modalidade *antisense*, foi encontrada uma banda de aproximadamente 700 pb, própria da região 3' completa do gene (Fig.16).

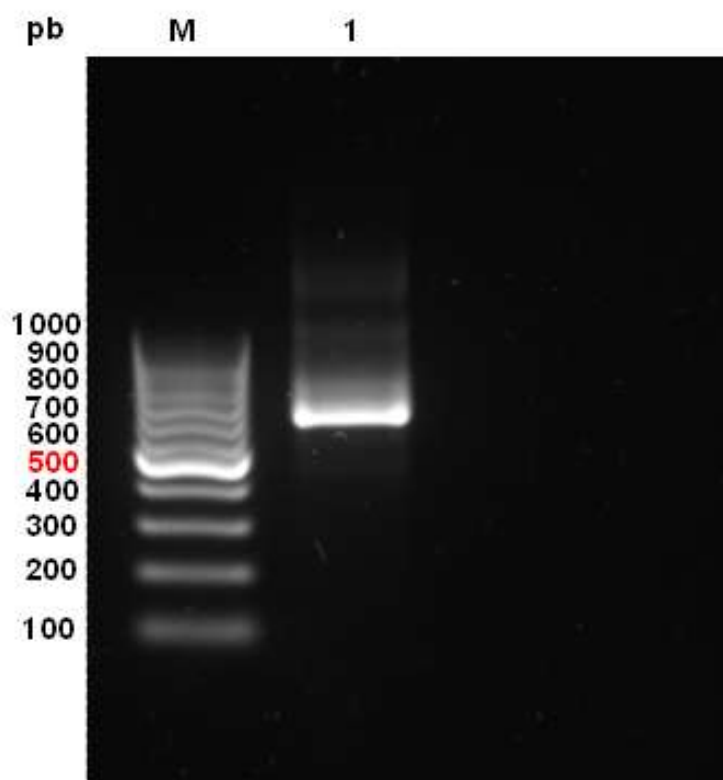


FIGURA 16. Banda de aproximadamente 700 pb relativa à região 3' UTR do cDNA de ag-FSH β .

4.2.3 Confirmação da sequência de cDNA de ag-FSH β

A confirmação da sequência total do cDNA de FSH β foi feita a partir de amostras de três hipófises diferentes. Foram utilizados *primers* específicos sense (#14) e o *primer* do *kit* (#8), *antisense*, utilizando as fitas simples previamente obtidas com o 3' RACE. Assim, se obteve uma sequência total de exatamente 913 bp, incluindo uma cadeia final de 20 A (poly A). Foi, portanto, identificada uma proteína de 126 aminoácidos, incluindo um suposto peptídeo sinalizador de 18 aminoácidos determinado pelo *software* SignalP 4.1 (Petersen *et al.* 2011). Na FIG. 17 estamos apresentando a sequência completa de aminoácidos e nucleotídeos relativa ao cDNA de ag-FSH β .

Ressaltamos que a sequência completa de cDNA ag-FSH β foi depositada no *GenBank* sob número de acesso KJ729119.

```

1 atgctggtaggagtcacaacagaagccttgagccttgctactatatacctcctctttgctacc 60
61 attgccgctgaactcaccgatgacacctgtatgctgctgctgctgctgcaaatggcctggcca 120
      M T C M L L L V V T M A W P
121 ctggtgggagctggccctcactgtgacctaacaacatcaccatccccctggagaacgag 180
      L V G A G P H C D L N N I T I P L E N E
181 gagtgtgaaaagtgcacaccattaccacaacctcctgcaactggctggtgtttcacccag 240
      E C E K C I T I T T T S C T G W C F T Q
241 gatcctgtgtacaagagctccctggccccatataccagcacacctgcaacttcaaagag 300
      D P V Y K S S L A P Y I Q H T C N F K E
301 gtggcctatgagtcagccttcctgcccagactgccctgaaggagtggaacccccatttcacc 360
      V A Y E S A F L P D C P E G V D P H F T
361 taccagtgccctcagctgcgagtgccagccggtgcaatacggacacacpghfctg 420
      Y P V A L S C E C S R C N T D T T D C G
421 gcactcagtgaaagaggtttcaggctgtcaggggacatagtcaccagctagagcacagagct 480
      A L S E E V S G C Q G H -
481 gtaagaaggcaaggccgatctaagaaatgactctttcttaaagtcagagtctgcaatta 540
541 aatattattccaagcaataaagcacatttagttggtctatttaactgtttgtttataag 600
601 ttaccttggtgccttgagacctctgaaaatgatgaatgatgaactgatgtgagttgaaa 660
661 ctatggaaggcagatgggccatcaggtttctgtagagcattcaaaggtgaattttgtaa 720
721 ggaaagtcagtcaagatgactgataactaaagtagcaaatttagtaaagttagtgattgt 780
781 ctaatacaatataagtttgatgataaaaaatgcaatgaaatgaaattctaataaattatt 840
841 ctaatttggttaaaaataagaacatttatcttgtattaaaatgctccagtataaaaaa 900
901 aaaaaaaaaaaaaa

```

FIGURA 17. Sequência total de nucleotídeos e de aminoácidos de ag-FSH β . M, metionina inicial; NIT, sítio de glicosilação; G, primeiro aminoácido do peptídeo maduro; C, cisteínas; P, prolínas; TAG, *stop codon*; TTT, sítio de glicosilação perdido; attaaa, sinal de poliadenilação; aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (n=20), cauda poly (A).

4.2.4 Alinhamento de sequências de aminoácidos de peptídeos de FSH β de diferentes espécies de peixes

Na FIGURA 18 podemos observar para o FSH β o mesmo tipo de alinhamento já feito para a subunidade alfa, realizado agora com a subunidade β de ag-FSH e aquelas de outras 40 espécies de peixes. Novamente, há regiões altamente conservadas, com apenas um sítio de glicosilação (NIT), já que o outro sítio de glicosilação (NTT) foi perdido transformando-se em (TTT). É possível ressaltar a presença de 12 cisteínas perfeitamente conservadas, relativas a seis pontes dissulfeto e duas prolínas que estão diretamente relacionadas com a direção estrutural do esqueleto da proteína.

Na FIG. 19, é apresentado o alinhamento conjunto de seqüências peptídicas de FSH β e de LH β de 41 espécies de diferentes peixes incluindo o *A. gigas*. Observa-se o alinhamento entre 82 seqüências. São identificadas várias regiões altamente conservadas relativas à interface do heterodímero, sendo 12 cisteínas, um sítio de glicosilação conservado, um sítio de glicosilação perdido e a região entre a 7ª e 8ª cisteína.

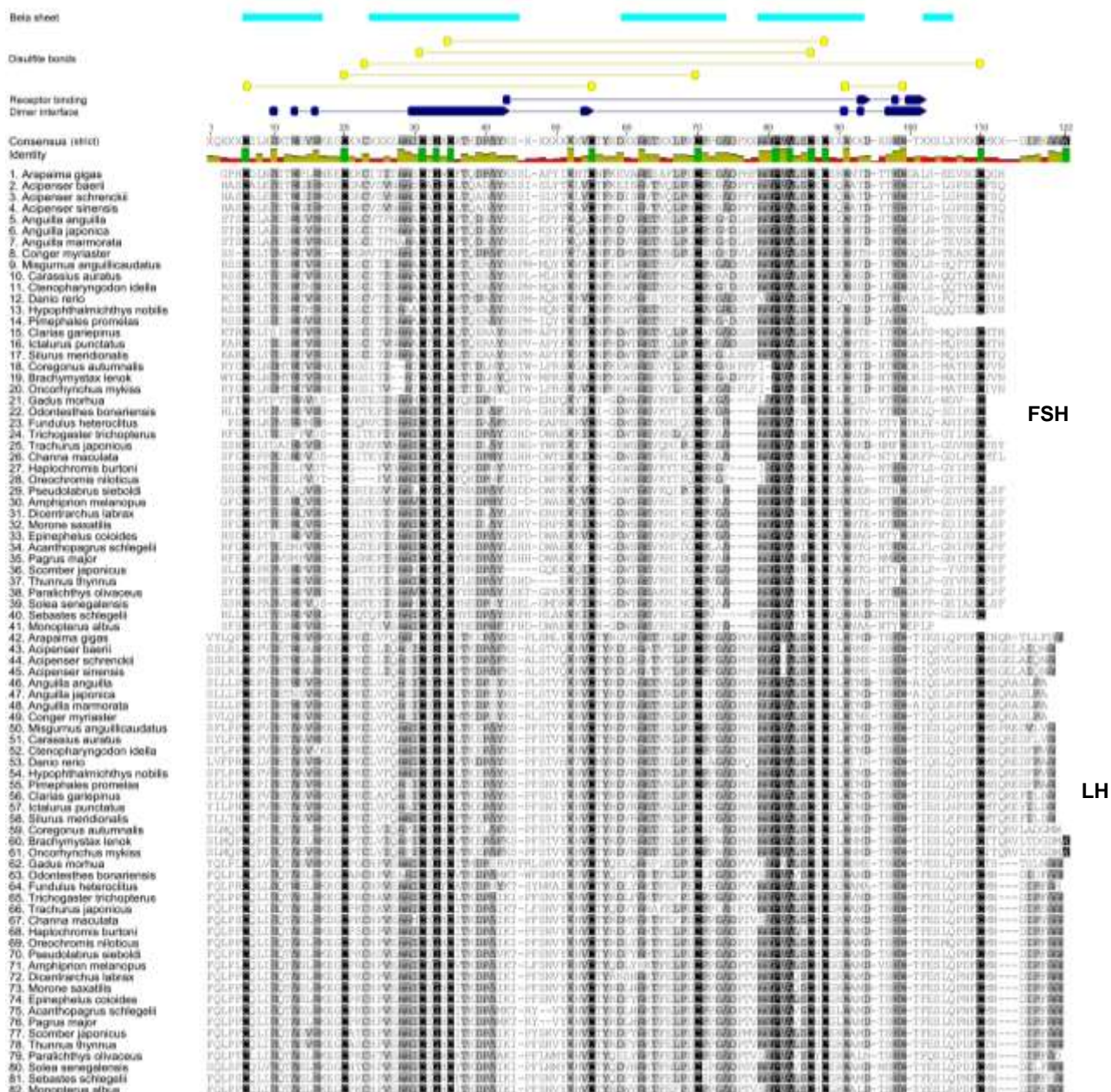


FIGURA 19. Alinhamento de seqüências de aminoácidos de FSH β e LH β de 40 espécies de peixes retiradas do *GenBank*, juntamente com aquelas de *A. gigas*.

4.2.5 Nível de identidade entre seqüências de aminoácidos de FSH β em diferentes ordens de peixes

A TAB. 6 apresenta as porcentagens de identidade, relativas à subunidade β de FSH, que relaciona o *A. gigas* (Osteoglossiformes) com mais 12 ordens de peixes. Há maior identidade com os Anguilliformes enquanto que a menor identidade é apresentada novamente pelos Gadiformes. É bastante evidente que há em geral uma identidade muito menor entre as subunidades β de FSH das várias ordens com relação àquela encontrada para o GTH α .

TABELA 6. Percentual de identidade de peptídeos maduros de FSH β e de LH β de *A. gigas* em diferentes ordens de peixes. O FSH está apresentado acima da diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Arapaima gigas</i>	-	51.5	60.9	51.6	53.0	44.1	33.0	37.6	37.4	36.3	35.7	36.4	35.0
2. Acipenseriformes (3)	55.6	-	48.7	44.7	49.4	39.0	27.8	35.2	33.9	33.4	32.0	32.4	33.3
3. Anguilliformes (4)	74.3	64.7	-	54.4	56.6	43.8	33.2	41.0	40.6	39.0	39.8	36.1	39.7
4. Cypriniformes (6)	75.6	63.4	77.8	-	66.6	47.0	33.6	40.0	37.9	39.7	40.4	40.8	39.1
5. Siluriformes (3)	74.9	61.3	75.7	80.2	-	44.8	35.5	40.4	38.0	40.5	41.3	37.9	39.8
6. Salmoniformes (3)	74.2	59.3	71.7	76.4	73.1	-	32.1	36.7	36.4	36.7	36.7	39.1	31.7
7. Gadiformes (1)	53.8	48.7	52.1	53.3	54.9	49.7	-	49.0	41.0	48.5	49.1	45.2	49.0
8. Atheriniformes (1)	57.6	46.6	53.0	56.6	58.5	57.1	59.8	-	60.0	58.1	57.3	51.9	59.4
9. Cyprinodontiformes (1)	55.1	47.5	52.1	54.8	54.8	51.6	59.0	70.7	-	53.9	49.5	49.0	58.5
10. Perciformes (14)	65.1	52.4	59.7	65.5	63.0	63.5	63.5	80.5	74.7	-	63.0	56.0	66.4
11. Pleuronectiformes (2)	59.7	50.4	55.4	61.3	60.7	59.1	60.2	76.7	69.0	79.5	-	56.7	66.6
12. Scorpaeniformes (1)	62.7	51.4	57.9	63.3	61.9	61.9	61.5	83.6	75.0	88.9	80.6	-	59.2
13. Synbranchiformes (1)	64.4	50.5	60.2	64.7	62.7	62.2	62.4	79.3	73.3	89.5	81.0	88.8	-

4.2.6 Árvore filogenética baseada na seqüência de aminoácidos de FSH β de diferentes espécies

A árvore filogenética construída com 41 seqüências de aminoácidos de FSH β de diferentes espécies de peixes incluindo o *A. gigas*, está apresentada na FIG. 20. Esta árvore apresenta uma boa definição filogenética, como podemos observar pelo número de clados encontrados com alto suporte.

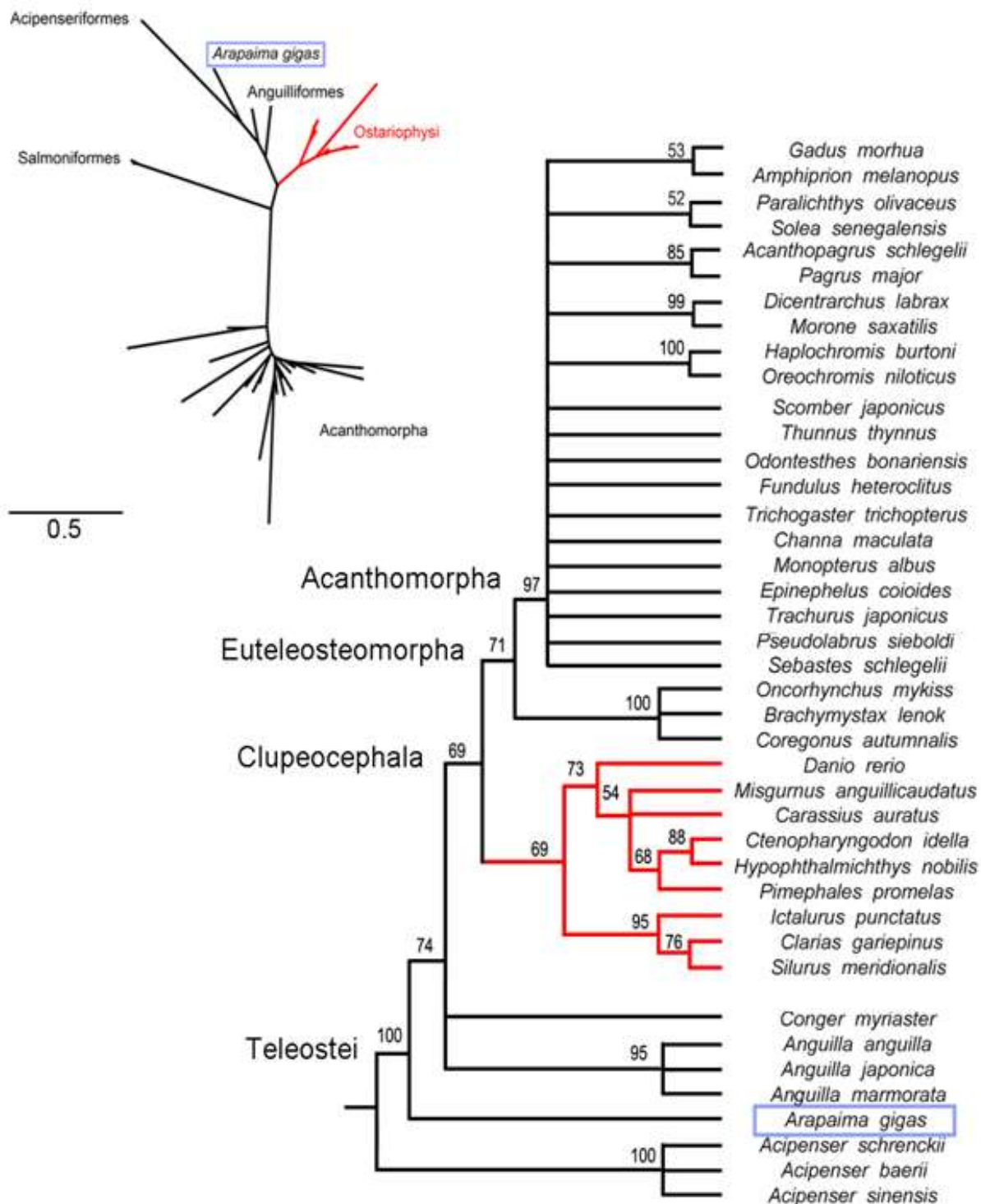


FIGURA 20. Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos do FSH β construída pelo método de *neighbour joining*, com 41 espécies diferentes de peixes, incluindo *A. gigas*. Três Acipenseriformes foram usados como grupo externo para enraizar a árvore. Os valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados acima dos ramos.

4.2.7 Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas de cDNA de FSH β e de LH β de diferentes espécies de peixes

Na FIG. 21 podemos observar alguns dados preliminares relativos à construção de uma árvore filogenética obtida utilizando todas as sequências de cDNA das subunidades β de FSH e de LH. Como primeira observação podemos dizer que as considerações relativas à árvore já construída para o GTH α foram confirmadas. De fato, o *A. gigas* (Osteoglossiforme) aparece alocado como grupo irmão dos Clupeocephala, enquanto que os Anguilliformes (Elopomorpha) são classificados como o grupo mais basal de todos os teleósteos.

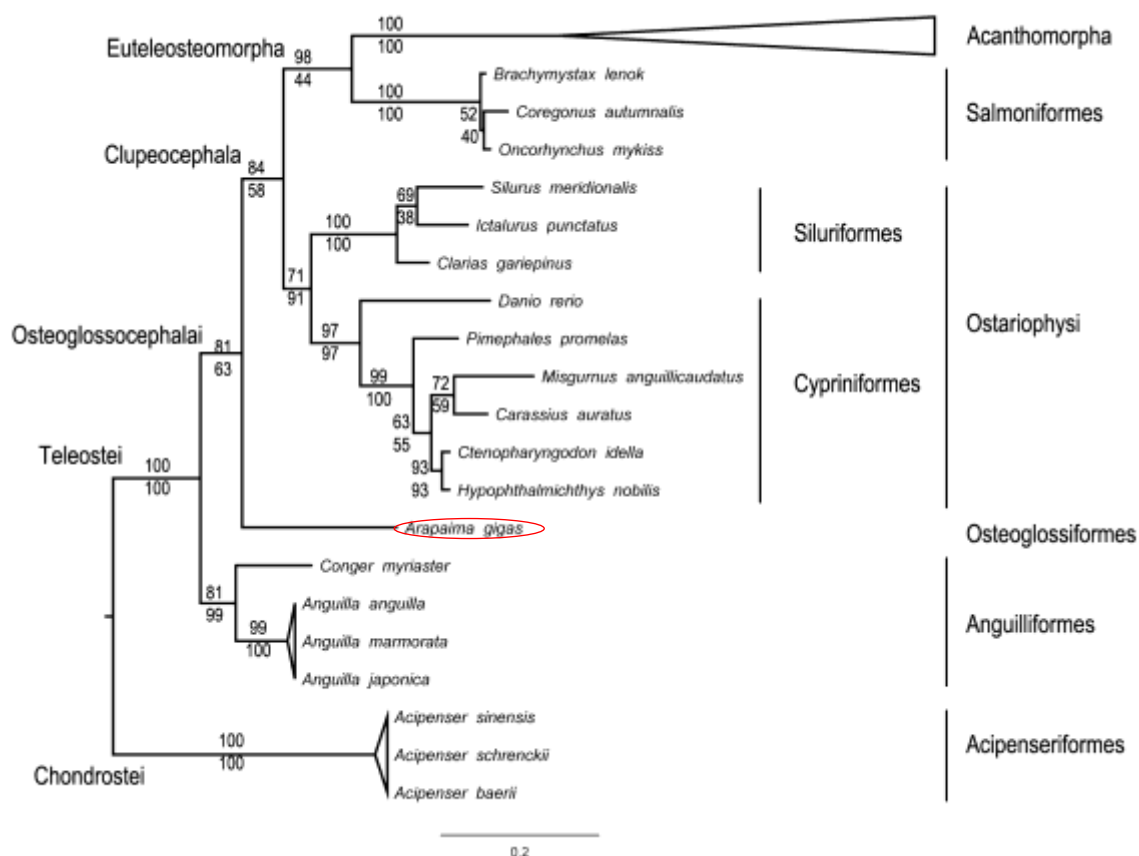


FIGURA 21. Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas de cDNA de FSH β e de LH β de *A. gigas*, juntamente com outras 40 espécies de peixes. Três Acipenseriformes foram usados como grupo externo para enraizar a árvore. Os valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados abaixo dos ramos para a árvore de máxima parcimônia, e acima dos ramos para a árvore de máxima verossimilhança.

4.2.8 Construção dos vetores de expressão para síntese de ag-FSH

Nas FIG. 22 e 23 estão representados os mapas dos vetores utilizados para a co-transfecção das células CHO-DHFR⁻, visando a síntese de ag-FSH. Foram empregados os mesmos vetores já usados pelo grupo de pesquisa do IPEN para obtenção de hTSH (Peroni *et al.* 2002) e de uma forma humanizada do mesmo hormônio (Damiani *et al.* 2009). No lugar dos cDNAs de h-GTH α e de h-TSH β foram introduzidos os cDNAs de ag-GTH α e ag-FSH β . Lembramos que, sendo a subunidade α comum às duas gonadotrofinas, o mesmo vetor ag-GTH α será utilizado também para a síntese de ag-LH β .

Outra observação importante está relacionada com o fato de que somente o vetor relativo à subunidade α contém o gene da DHFR que, em células CHO-DHFR⁻, pode ser utilizado para amplificação gênica mediante adição de concentrações crescentes de metotrexato (MTX) ao meio de cultivo. Não foi empregado o mecanismo de amplificação da subunidade β (ADA) que se demonstrou pouco eficiente. Uma quantidade cinco vezes maior desta subunidade foi utilizada na co-transfecção. Desta forma, foram aumentadas as probabilidades de entrada do cDNA de ag-FSH β na mesma região cromossômica onde também entrou o cDNA do ag-GTH α , providenciando, assim, uma amplificação em conjunto (co-amplificação).

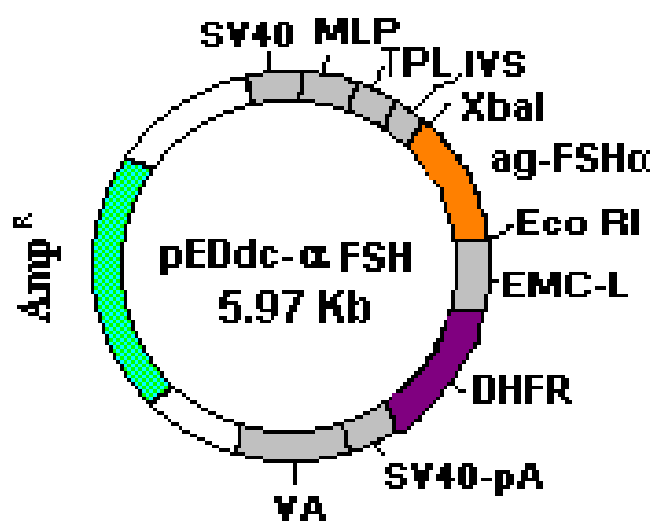


FIGURA 22. Esquema do vetor de expressão para a subunidade alfa, incluindo o cDNA relativo ao GTH α de *A. gigas*.

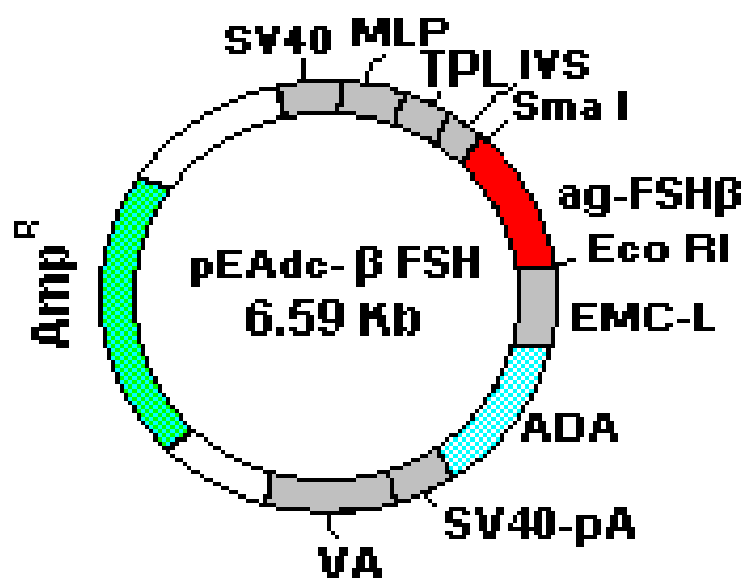


FIGURA 23. Esquema do vetor de expressão para a subunidade beta, incluindo o cDNA relativo ao FSH β de *A. gigas*.

4.2.9 Teste de eficiência da transfecção

Na FIG. 24 podemos observar o resultado de uma reação de PCR realizada utilizando *primers* específicos para cada uma das subunidades no DNA de células CHO, transfectadas ou não transfectadas com os vetores de expressão contendo o cDNA relativo ao ag-GTH α ou ag-FSH β . De fato, nas células não transfectadas não são encontrados os genes de interesse, enquanto que no extrato de células transfectadas as duas bandas são evidentes e confirmam a presença de cada uma das subunidades. Isto indica que os cDNA de ag-GTH α e de ag-FSH β entraram eficientemente nas células transfectadas.

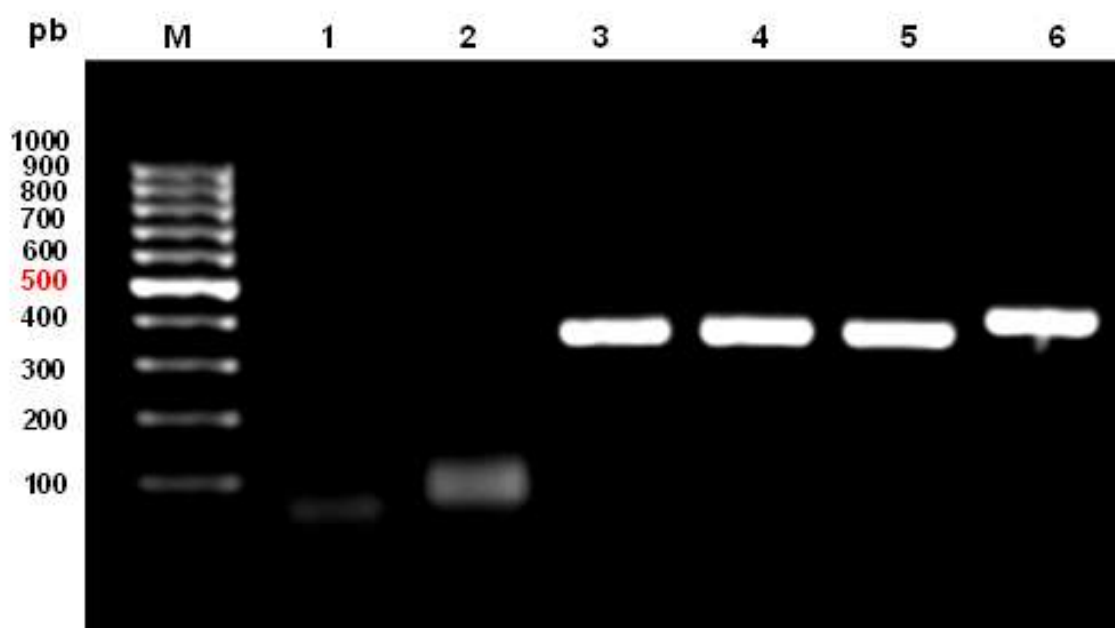


FIGURA 24. Gel de agarose corado com brometo de etídio, relativo a reações de PCR: (M) marcador de peso molecular (1Kb); (2) células não transfectadas, α ; (3) células não transfectadas, β ; (4 e 5) células transfectadas, α ; (6 e 7) células transfectadas, β .

5 DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e análise do cDNA da subunidade alfa do FSH de *A. gigas*

A sequência completa do cDNA que codifica a subunidade α das gonadotrofinas de *A. gigas* (ag-GTH α) foi sintetizada e caracterizada pela primeira vez. Também pela primeira vez em um segundo tempo, foi sequenciada e caracterizada a subunidade β de foliculotrofina (ag-FSH β) da mesma espécie. Os dois genes estão sendo usados para realizar a síntese deste hormônio em células CHO. Lembramos que a subunidade α é também comum à outra gonadotrofina, a luteotrofina (LH) e que, portanto, deverá ser usada também para a síntese desta glicoproteína, como poderia ser usada para a síntese da tireotrofina de *A. gigas* (ag-TSH). Ambos os hormônios gonadotróficos estão diretamente relacionados com a fertilidade de todas as espécies de vertebrados.

Quando comparada com as correspondentes sequências de peptídeos de GTH α de outras espécies de peixes, já relatados na literatura ou no *GenBank*, o ag-GTH α apresentou alta identidade com aquelas de outros teleósteos (Anguilliformes e Ostariophysi) e também dos Chondrostei (Acipenseriformes), com identidades variando de 87,1 a 89,5%. Isto concorda com resultados encontrados para grupos monofiléticos como os Salmoniformes, os Pleuronectiformes e os Acanthopterygii.

Os Salmoniformes e os Pleuronectiformes apresentaram por outro lado, a identidade intra-ordem mais baixa, o que poderia estar relacionado à existência de formas divergentes de GTH α , como podemos ver na representação do alinhamento, das espécies do Salmoniforme *Onchorynchus* (FIG.11). Os Acanthomorpha, representados pelos Acanthopterygii e pelos Gadiformes, apresentaram baixa identidade não somente com *A. gigas*, mas também com outras ordens analisadas, sendo os valores mais baixos aqueles relativos aos Gadiformes e aos Cyprinodontiformes. O nível de identidade que existe entre *A. gigas* e os Acanthomorpha, que varia de 55% a 70%, foi similar àquele encontrado entre o *A. gigas* e os vertebrados terrestres: 66,1% com (*Rattus norvegicus*), 67,8% com camundongos (*Mus musculus*) e 66,7% com os humanos (*Homo sapiens*). As relações filogenéticas ajudam, portanto, a interpretar a

variação na sequência de aminoácidos encontrada para o GTH α nos peixes, indicando que esta subunidade relativamente bem conservada, presente nas ordens basais dos teleósteos e dos Acipenseriformes, evoluiu gradativamente para os GTHs que estão presentes nos Acanthopterygii e nos Gadiformes (Paracanthopterygii). Outras 34 espécies de teleósteos confirmaram quatro regiões bem conservadas no peptídeo maduro. Especificamente 10 resíduos de cisteína, responsáveis pela formação de cinco pontes dissulfeto, dois sítios de N-glicosilação *N-linked* e três resíduos de prolina, possivelmente relacionados com a direção do esqueleto da estrutura protéica apareceram como estruturas funcionais altamente preservadas no GTH α de *A. gigas*.

Como é conhecido, as cadeias de carboidratos presentes nos sítios de glicosilação regulam o processo de união das subunidades e estimulam as funções que desencadeiam a ativação da proteína G e a síntese do segundo mensageiro, depois da ligação do hormônio ao seu receptor (Roch *et al.* 2009).

As 12 ordens e as 38 espécies investigadas neste trabalho, incluindo o *A. gigas* (Osteoglossiformes), possuem em geral sequências NIT e NHT que expressam dois sítios de glicosilação em suas subunidades GTH α . A exceção é o *Muraenesox sinereus* (Anguilliforme), que possui um aminoácido D no lugar do N na posição 56, perdendo assim o primeiro sítio de glicosilação, enquanto o *Gadus morhua* (Gadiforme) apresenta Q no lugar de H na posição 86, mantendo o sítio de glicosilação.

O sítio de clivagem do peptídeo sinalizador do ag-GTH α foi calculado por nós mediante a utilização de um *software* de bioinformática baseado em vários parâmetros. Porém este sítio de clivagem somente poderá ser efetivamente conhecido mediante a síntese do ag-FSH ou do ag-LH. De acordo com os parâmetros de bioinformática, este sítio de clivagem foi identificado entre os aminoácidos 24 (S) e 25 (N). Das 38 espécies mostradas na FIG. 11, 33 delas apresentaram tirosina (Y), quatro apresentaram outros aminoácidos (D, F, G, H) e somente uma (*A. gigas*) apresentou uma asparagina (N), como suposto primeiro aminoácido do peptídeo maduro da subunidade α . A posição da clivagem do peptídeo sinalizador está de acordo com a maioria dos supostos sítios de clivagem relatados na literatura, variando nos teleósteos de 18 a 28 aminoácidos.

O sinal de poliadenilação ATTAAA do ag-GTH α não é sequência consenso, quando comparada com a sequência altamente conservada AATAAA presente em todos os vertebrados e situada 15-25 nucleotídeos acima dos sítios de adição do *poly* (A). O sinal ATTAAA, porém concorda com os sinais análogos do esturjão russo, do *Striped bass*, do *Coho salmoni* e da tilápia (Hassin *et al.* 1995; Dickey e Swareson, 2000; Gur *et al.* 2001; Hurvitz *et al.* 2005). A sequência ATTAAA mostrou de fato, ser a mutação mais moderada, correspondendo à variante natural mais comum e gerando um RNA cuja eficiência de poliadenilação e de clivagem ainda é 70-80% daquela apresentada pelo RNA que contém o sítio consenso, AATAAA (Sheets *et al.* 1990).

Existem poucos estudos relativos a hipóteses filogenéticas para os Osteoglossomorpha baseados em dados moleculares. O'Neill *et al.* (1998) sugeriu que pode não se tratar de um grupo monofilético, com base em uma forma de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Empregando sequências mitocondriais do citocromo b e dos genes ND2, Kumazawa e Nishida (2000) sugeriram que a família Arapaimidae (*Heteroticus niloticus* e *A. gigas*) forma um grupo irmão dos Osteoglossídeos. Al-Mahrouki *et al.* (2001) isolaram e sequenciaram o cDNA da pre-proinsulina de quatro espécies de Osteoglossomorpha, mostrando que o grupo não era monofilético e sugerindo que também não era o mais basal dos teleósteos vivos. Com base em cinco marcadores moleculares, Lavoué e Sullivan (2004) confirmaram que os Osteoglossomorpha representam um grupo monofilético. Mu *et al.* (2010) usaram a sequência gênica completa do citocromo b mitocondrial para esclarecer a estrutura gênica e as relações existentes na evolução de quatro gêneros específicos da família Osteoglossidae. Por outro lado, Han e Yu (2002), em estudo relativo à diversidade filogenética e à evolução da subunidade GTH α em peixes, obtiveram este cDNA em duas espécies de Synbranchiformes, que foi comparado com as análogas sequências de peptídeos maduros de 31 espécies de peixes, pertencentes a nove ordens. Nenhuma destas, porém, é representativa da superordem dos Osteoglossomorpha.

O estudo relativo à subunidade ag-GTH α estabeleceu uma hipótese filogenética, comparando este mesmo peptídeo com aqueles de outros 34 teleósteos. Representa, portanto, 12 ordens e 38 espécies de peixes, incluindo os

três Acipenseriformes que foram escolhidos como grupo externo (*outgroup*) por serem os parentes mais próximos dos teleósteos cujas sequências de GTH α são conhecidas.

Diferentemente de outros estudos que mais recentemente analisaram a topologia dos Osteoglossomorpha, ainda que excluindo ou usando outros teleósteos como grupo externo (Lavoué e Sullivan, 2004; Mu *et al.* 2010), o presente estudo foi aquele que analisou o maior número de espécies de teleósteos. A árvore filogenética resultante alocou os Osteoglossomorpha como grupo irmão dos Clupeocephala, enquanto que os Elopomorpha (Anguilliformes) aparecem como o grupo mais basal de todos os Teleósteos aqui analisados, confirmando estudos anteriores de Arratia *et al.* (1991), Li e Wilson (1999) e Hilton *et al.* (2003). Esta perspectiva, portanto é divergente da filogenética tradicional, que alocava os Osteoglossomorpha como grupo mais basal dos teleósteos vivos (Patterson e Rosen, 1977). A análise filogenética relativa à subunidade ag-GTH α contribui, portanto, com as tentativas de identificar o grupo irmão mais basal de todos os outros teleósteos vivos (Arratia *et al.* 2001). Para chegar a uma conclusão definitiva é necessário, porém, que seja analisado um número maior de amostras taxonômicas de Osteoglossomorpha e também outras regiões gênicas.

5.2 Isolamento e análise da subunidade beta do FSH de *A. gigas*

A sequência de aminoácidos do peptídeo maduro ag-FSH β apresentou duas prolinas e as 12 cisteínas conservadas, típicas também dos tetrápodes, mas perdeu o segundo sítio *N-linked* de glicosilação (posição de aa 25-27), como foi visto no alinhamento com as sequências de outros 37 teleósteos e de três Acipenseriformes.

Lembramos a respeito da glicosilação, que esta é a modificação pós-traducional mais frequente nas proteínas e que seu impacto é crucial para a atividade biológica. Com base no tipo de ligação existente entre aminoácido e carboidrato em eucariotos, a glicosilação pode ser classificada em vários tipos, sendo os mais comuns a N- e O- glicosilação (Chauhan *et al.* 2013). Até agora, para o FSH β e LH β , foi descrita somente a glicosilação *N-linked*, seus sítios sendo altamente conservados ao longo da evolução, o que indica a importância

ocupada por esta modificação nas proteínas. Em comparação com a *N-linked*, onde a sequência *consensus* N-X-S/T (X sendo qualquer aa exceto a prolina) é bem estabelecida, a glicosilação *O-linked* não possui nenhuma sequência *consensus* definida, o que faz sua predição bem mais complicada. Há, porém, alguma condição que parece favorecer a glicosilação *O-linked* e que pode ser a presença dessas prolinas e da conformação “ β -sheet” que está normalmente presente em proximidade destes sítios. Em ag-FSH β foram encontrados, além do único sítio *N-linked*, 12 sítios potenciais de O-glicosilação, um dos quais (na posição aa 27), poderia representar um possível substituto para o sítio *N-linked* perdido. Além disto, em ag-FSH β , não foi encontrado nenhum potencial sítio de C-glicosilação.

Bastante interessante foi também o alinhamento feito juntando as sequências de FSH β e de LH β (n=82), como mostrado na FIG. 19. Os peptídeos maduros das duas subunidades β revelaram uma identidade de 46%, que indicou posições altamente conservadas entre os dois hormônios. Além das 12 cisteínas e do primeiro sítio de N-glicosilação, outras interessantes posições conservadas entre ag-FSH β e ag-LH β estão relacionadas com a região de interface do dímero, com o segundo sítio de N-glicosilação perdido nas duas subunidades β e com a região conservada entre a 7^a e a 8^a cisteína. Nesta região, estão também concentradas as duas prolinas altamente conservadas, que parecem essenciais para definir a direção do esqueleto da estrutura proteica. Tudo isto indica claramente que as duas subunidades β e, portanto, os dois hormônios (FSH e LH) devem ser derivados de um gene ancestral comum, o que já foi postulado por outros autores (Kawauchi e Sower, 2006; Uchida *et al.* 2013)

Quando as sequências de aa do ag-FSH β foram comparadas com aquelas dos correspondentes peptídeos de outras espécies de peixes, os menores níveis de identidade foram encontrados com os Acanthomorpha, especialmente os Gadiformes, enquanto que as maiores identidades foram encontradas com os teleósteos basais: Anguilliformes, Cypriniformes e Siluriformes. Mesmo em nível maior, análogas identidades tinham sido descritas também para a subunidade GTH α , como mencionado e publicado anteriormente (Faria *et al.* 2013). Além disto, novamente, a comparação com Acipenseriformes

forneceu valores de identidade relativamente maiores também para a subunidade β do FSH, como pode ser visto na TAB. 6.

Apresentamos duas árvores filogenéticas construídas com 41 sequências de FSH β : uma relativa aos aminoácidos do peptídeo maduro, e outra construída com as sequências de cDNA, concatenando os cDNAs de FSH β e de LH β . A última mostrou uma maior definição filogenética, exceto para os Acanthomorpha, para os quais o suporte foi de aproximadamente <50%. No restante, esta árvore confirmou a visão já encontrada para a subunidade GTH α , pelo qual os Osteoglossomorpha estão alocados como grupo irmão dos Clupeocephala, enquanto os Anguilliformes aparecem como a primeira divergência entre os teleósteos. Com esta mesma abordagem, Siluriformes e Cypriniformes formam um grupo monofilético (Ostariophysi), grupo irmão dos euteleósteos.

Como já mencionado, a visão convencional de que os Osteoglossomorpha sejam a primeira linhagem divergente dos teleósteos (Paterson e Rosen 1977; Lauder e Liem, 1983) foi contestada recentemente por Arratia, que alocou os Anguilliformes como primeira ramificação basal. Esta posição tem sido observada por outros estudos morfológicos (Diogo *et al.* 2003; Zhang *et al.* 1998; Li e Wilson 1999) e moleculares (Broughton *et al.* 2013; Faria *et al.* 2013), mesmo que um estudo recente relativo ao DNA mitocondrial tenha resultado a favor da divergência basal dos Osteoglossomorpha. Broughton *et al.* (2013) forneceu uma explicação a respeito desta contradição, justificando que isso pode acontecer quando tempos relativamente curtos separam eventos divergentes, produzindo um sinal filogenético reduzido. Assim, diversas árvores gênicas podem diferir da árvore filogenética verdadeira e, portanto, dados concatenados podem melhor refletir a realidade. Isso explicaria a contradição entre as árvores, onde a árvore gênica (de aa do FSH β) apresenta o *A. gigas* como mais basal dos teleósteos enquanto que as árvores das sequências de cDNA concatenadas do FSH β e do LH β e a árvore relativa à subunidade do GTH α apresentam os Anguilliformes nesta região, o que está de acordo com a literatura recente.

5.3 Expressão do ag-FSH em células CHO

Não podemos esquecer, contudo, que os estudos de filogenia mesmo sendo de grande interesse não são o objetivo principal deste trabalho, que está continuando na direção da síntese, purificação e caracterização do ag-FSH. Como foi apresentado nos resultados, já foram construídos os dois vetores de expressão para as subunidades α e β . Com estes vetores foram transfectadas células CHO-DHFR⁻ que estão sendo cultivadas e submetidas à amplificação gênica mediante utilização de concentrações crescentes de metotrexato, com o objetivo de obter níveis úteis (>1 $\mu\text{g/mL}$) de ag-FSH no meio de cultura. Esta parte do trabalho se encontra, portanto, em andamento.

No geral, a parte referente à identificação, à clonagem e à caracterização dos cDNAs de ag-GTH α e de ag-FSH β revelou dificuldades imprevistas, além da parte técnica ligada às inúmeras reações de PCR, como por exemplo as dificuldades relativas à obtenção das glândulas hipofisárias de *A. gigas* no estado de São Paulo. A nossa estratégia foi se concentrar inicialmente no estudo da subunidade α , incluindo a primeira fase da análise filogenética, que permitiu a publicação de trabalho original em revista prestigiosa neste campo e que permitiu a aprovação de um projeto para financiar a continuidade da pesquisa que emprega metodologias particularmente caras. Outro trabalho relativo ao isolamento, à clonagem e à caracterização da subunidade β do ag-FSH e do ag-LH foi submetido para publicação. Ainda permanece a dificuldade da expressão deste hormônio de peixe em células de mamífero, devido não somente às dificuldades intrínsecas relativas à sua síntese, mas também às dificuldades relacionadas com sua detecção, visto que se trata de um hormônio nunca sintetizado anteriormente e para o qual não existem, obviamente, nem padrões, nem anticorpos específicos para sua detecção e quantificação.

Talvez uma estratégia para minimizar as dificuldades acima apresentadas possa ser o desenvolvimento de um anticorpo específico contra o ag-FSH, que em combinação com a técnica de radioimunoensaio disponível em nosso laboratório possibilitaria a detecção desta glicoproteína. Na literatura existem, de fato, trabalhos relativos à expressão de glicoproteínas recombinantes

que empregam estratégia análoga para detecção de FSH biologicamente ativo de *Anguilla japonica* proveniente da expressão em leveduras metilotróficas (Kamei *et al.* 2003).

6 CONCLUSÕES

- Pela primeira vez foi isolado o cDNA das subunidades α e β do ag-FSH, possibilitando assim a construção de vetores de expressão dicistrônicos visando a síntese de ag-FSH em células CHO.
- Isto proporciona novas possibilidades de investigação nas áreas da endocrinologia e da reprodução do *A. gigas* e de outros teleósteos.
- A árvore filogenética construída posicionou os Osteoglossomorpha como grupo irmão dos Clupeocephala, enquanto que os Elopomorpha (Anguilliformes) apareceram como o grupo mais basal de todos os teleósteos aqui analisados, o que está de acordo com outros trabalhos previamente publicados, especialmente aquele relativo ao estudo da subunidade α do GTH de *A. gigas*.
- Quando comparado com outros trabalhos disponíveis na literatura, o presente estudo foi o que analisou o maior número de espécies de teleósteos.
- Ainda permanece o desafio quanto à expressão, à detecção e à caracterização do ag-FSH no meio de cultivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AL-MAHROUKI, A.A., IRWIN, D.M., GRAHAM, L.C., YOUSON, J.H. Molecular cloning of preproinsulin cDNAs from several osteoglossomorphs and a cyprinid. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. **174**, p. 51-8, 2001.
- 2- ALMEIDA, B.E., OLIVEIRA, J.E., CARVALHO, C.M., DALMORA, S.L., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. **53**, p. 90-7, 2010.
- 3- ALMEIDA, B.E., OLIVEIRA, J.E., DAMIANI, R., DALMORA, S.L., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. A pilot study on potency determination of human follicle stimulating hormone: a comparison between reversed phase high performance liquid chromatography method and the in vivo bioassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. **34**, p. 681-6, 2011.
- 4- ALMEIDA, B.E., OLIVEIRA, J.E., DAMIANI, R., DALMORA, S.L., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. *Pharm. Biomed. Anal.*, v. **63**, p. 160-4, 2012.
- 5- ARRATIA, G. The caudal skeleton of Jurassic teleosts: a phylogenetic analysis. In: Chang, M.M., Liu, Y.H., Zang, G.R. (Eds) Early vertebrates and related problems in evolutionary biology. *Sci. Press.*, Beijing, p. 249–340, 1991.
- 6- ARRATIA, G. The sister group of teleostei: consensus and disagreements. *J. Vertebr. Paleontol.*, v. **21**, p. 767-73, 2001.
- 7- BERLINSKY, D.L., WILLIAN, K., HODSON, R.G., SULLIVAN, C.V. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dendatus*. *J. World. Aqua. Soc.*, v. **27**, p. 143-152, 1997.
- 8- BORELLA, M.I., VENTURIERI, R., MANCERA, M.J. Immunocytochemical identification of adenohipophyseal cells in the pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian basal teleost. *Fish. Physiol. Biochem.*, v. **35**, p. 3-16, 2008.
- 9- BORGHETTI, N.R.B., OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J.R. Aquicultura uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. *Curitiba: grupo integrado de aquicultura e estudos ambientais, (GIA)*, p.128, 2003.

- 10- BROUGHTON, R.E., BETANCUR-R, R., LI, CHENHONG., ARRATIA, G., ORTI, G. Multi-locus phylogenetic analysis reveals the pattern and tempo of bony fish evolution. *PLOS Currents tree of life*. Eds., v. 5, p. 1-33, 2013. doi: 10.1371/currents.tol.2ca8041495ffafd0c92756e75247483e.
- 11- BROMAGE, N., JONES, J., RANDALL, C., THRUSH, M., SPRINGATE, J., DUSTON, J., BARKER, G. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aqua.*, v. 100, p. 141-66, 1992.
- 12- CARVALHO, C.M., OLIVEIRA, J.E., ALMEIDA, B.E., UEDA, E.K.M., TORJENSEN, P.A., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Efficient isolation of the subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. *J. Chromatogr. A.*, v. 1216, p. 1431-1438, 2009.
- 13- CAO, H., ZHOU, L., ZHANG, Y.Z., WEI, Q.W., CHEN, X.H., GUI, J.F. Molecular characterization of Chinese sturgeon gonadotropins and cellular distribution in pituitaries of mature and immature individuals. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 303, p. 34-42, 2009.
- 14- CAVERO, B.A.S., ITUASSÚ, D.R., PEREIRA-FILHO, M., ROUBACH, R., BORDINHON, A.M., FONSECA, F.A.L., ONO, E.A. Uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 38, n.8, p. 1011-15, 2003.
- 15- CERDÀ, J., CHAUVIGNE, F., AGULLEIRO, M.J., MARIN, E., HALM, S., MARTINEZ-RODRIGUEZ, G., PRAT, F. Molecular cloning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits and expression. Pattern during spermatogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 156, p. 470-481, 2008.
- 16- CHÁVEZ, J.P. Plano de manejo de paiche en las cochas de punga. Programa integral de desarrollo y conservación, *Ed. Ceta. Iquitos.*, Peru, 2002.
- 17- CHOI, E., KO, H., SHIN, J., KIM, M., SOHNY, C. Expression of gonadotropin genes in manchurian trout *Brachymystax lenok* and production of recombinant gonadotropins. *Fish. Sci.*, v. 71, p.1193–200, 2005.
- 18- CHAUAN, J.S., RAO, A., RAGHAVA, G.P.S. *In silico* platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PLOS ONE.*, v. 8(6): e67008, p. 1-10, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0067008.

- 19- DAMIANI, R., OLIVEIRA, J.E., VORAUER-UHL, K., PERONI, C.N., VIANNA, E.G., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing α 2,6-sialyltransferase. *Prot. Expr. Purifi.*, **v. 67**, p. 7-14, 2009.
- 20- DEGANI, G., GOLDBERG, D., TZCHORI, I., HURVITZ, A., YOM, D.I.N.S., JACKSON, K. Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSH-beta subunit, and expression of FSH-beta and LH-beta in males and females after sex determination. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **v.136**, p. 283-93, 2003.
- 21- DICKEY, J.T., SWANSON, P. Effect of salmon gonadotropin releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **v. 118**, p. 436-49, 2000.
- 22- DIOGO, R. The origin of higher Clades: Osteology, myology, phylogeny and Evolution of bony Fishes and the Rise of Tetrapods. Enfield, N.H: *Sci. Publ*, 2007.
- 23- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids. Res.*, **v. 32**, **n. 5**, p. 1792-7, 2004.
- 24- FARIA, M.T., CARVALHO, R.F., SEVILHANO, T.C.A., OLIVEIRA, N.A.J., SILVA, C.P.F., OLIVEIRA, J.E., SOARES, C.R.J., GARCEZ, R., SANTO, P.R.E., BARTOLINI, P. Isolation of the gonadotrophic α -subunit hormone of the giant amazonian fish: pirarucu (*Arapaima gigas*). *Fish. Physiol. Biochem.*, **v. 39**, p. 686-93, 2013.
- 25- FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. *T. Am. Natu.*, **v. 125**, **n. 1**, p. 1-15, 1985.
- 26- FONTAINE, M. Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. *Adv. Mar. Biol.*, **v. 13**, p. 241-235, 1975.
- 27- GODINHO, H.P., SANTOS, J.E., FORMAGIO, P.S., GUIMARÃES-CRUZ, R.J. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta. Zool. Sthlm.*, **v. 86**, p. 289–94, 2005.
- 28- GUR, G., ROSENFELD, H., MELAMED, P., MEIRI, I., ELIZUR, A., LARON, Z. Tilapia glycoprotein hormone α subunit: cDNA cloning and hypothalamic regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **v. 182**, p. 49-60, 2001.

- 29- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **v. 41**, p. 95-8, 1999.
- 30- HAN, Y.S., YU, J.Y.L. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNAs for pituitary glycoprotein hormone alpha subunits from two species of Synbranchiformes, *Monopterus albus* and *Ophisternon bengalense*. *Fish. Physiol. Biochem.*, **v. 26**, p. 111-20, 2002.
- 31- HASEGAWA, M., KISHINO, H., YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, **v. 22**, p. 160-74, 1985.
- 32- HASSIN, S., ELIZUR, A., ZOHAR, Y. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin-I and II subunits. *J. Mol. Endocrinol.*, **v. 15**, p. 23-35, 1995.
- 33- HILTON, E.J. Comparative osteology and phylogenetic systematics of fossil and living bony-tongue fishes (Actinopterygii, Teleostei, Osteoglossomorpha). *Zool. J. Linn. Soc.*, **v. 137**, p. 1-100, 2003.
- 34- HUANG, H., ZHANG, Y., HUANG, W., LI, S., ZHU, P., LIU, Y., YIN, S., LIU, X., LIN, H. Molecular characterization of marbled eel (*Anguilla marmorata*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during artificially induced gonadal development. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **v. 162**, p.192-202, 2009.
- 35- HURVITZ, A., DEGANI, G., GOLDBERG, D., DIN, S.Y., JACKSON, K., LEVAVI-SIVAN, B. Cloning of FSH beta, LH beta, and glycoprotein alpha subunits from the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **v. 140**, p. 61-73, 2005.
- 36- JÉGUA, M., KEITH, P. Le bas Oyapock limite septentrionale ou simple étape dans la progression de la faune des poissons d'Amazonie occidentale. *Life. Sci.*, **v. 322**, p. 1133-43, 1999.
- 37- JUNK, W.J., PIEDADE, M.T.F. Status of knowledge, ongoing research, and research needs in Amazonian Wetlands. *Wetl. Ecol. Manag.*, **v. 12**, p. 597-609, 2004.

- 38- KAMEI, H., OHIRA, T., YOSHIURA, Y., UCHIDA, N., NAGASAWA, H., AIDA, K. Expression of a biologically active recombinant follicle-stimulating hormone of Japanese eel, *Anguilla japonica*, using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **v. 134**, p. 244-254, 2003.
- 39- KASUTO, H., LEVAVI-SIVAN, B. Production of biologically active tethered tilapia LH beta alpha by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **v.140**, p. 222-32, 2005.
- 40- KAUFMAN, J.R., DAVIES, V.M., WASLEY, C.L., MICHNICK, D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucl. Acids. Res.*, **v.19**, p. 4485-90, 1991.
- 41- KAWAUCHI, H., SOWER, S.A. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **v. 148**, p. 3-14, 2006.
- 42- KAZETO, Y., KOHARA, M., MIURA, T., YAMAGUCHI, S., TRANT, J.M., ADACHI, S., YAMAGUCHI, K. Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by *drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biol. Reprod.*, **v. 79**, p. 938-946, 2008.
- 43- KOBAYASHI, M., KATO, Y., YISHIURA, Y., AIDA, K. Molecular cloning of cDNA encoding two types of pituitary gonadotropins alpha subunit from the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **v. 105**, p. 372-378, 1997.
- 44- KOBAYASHI, M., MORITA, T., IKEGUCHI, K., YOSHIKAZI, G., SUZUKI, T., WATABE, S. Production of recombinant goldfish gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *Fish. Physiol. Biochem.*, **v. 28**, p. 469-471, 2003.
- 45- KUMAZAWA, Y., NISHIDA, M. Molecular phylogeny of osteoglossids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. *Mol. Biol. Evol.*, **v. 17**, p. 1869-70, 2000.
- 46- LAUDER, G.V., LIEM, K.F. The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *B. Museum. Comp. Zool.*, **v. 150**, p. 95-197, 1983.
- 47- LAVOUÉ, S., SULLIVAN, J.P. Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *Mol. Phylogenet. Evol.*, **v. 32**, p. 171-85, 2004.

- 48- LI, G.Q., WILSON, M.V.H. Early divergence of Hiodontiformes sensu stricto in East Asia and phylogeny of some late Mesozoic teleostes from China. In: *Arratia, G, Schultze, H.P. (eds) Mesozoic Fishes 2-systematic and fossil records*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, Munchen, p. 369-84, 1999.
- 49- LOUREIRO, R.F., OLIVEIRA, J.E., TORJESEN, P.A., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Analysis of intact human follicle stimulating hormone preparations by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, v. **1136**, p. 10-8, 2006.
- 50- MENDONÇA, F., OLIVEIRA, J.E., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotropin and its immunological, biological, physic-chemical and mass spectral characterization. *J. Chromatogr. A.*, v. **1062**, p.103-12, 2005.
- 51- MITTELHOLZER, C., ANDERSSON, E., TARANGER, G.L., KARLSE, O., NORBERG, B. Quantification of gonadotropin subunits GP α , FSH β and LH β mRNA expression from atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout a reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol B.*, v. **153**, p. 288-295, 2009.
- 52- MU, X., WANG, P., HU, Y., WANG, X., SONG, H., LI, X., LUO, J. Molecular phylogenetic studies of Osteoglossidae based on the sequences of complete mitochondrial cytochrome b gene. *J. South. China. Agricul. Univ.*, v. **31**, p. 100-3, 2010.
- 53- NARAYAN, P., WU, C., PUETT D. Genetic engineering of single-chain gonadotropins and hormone-receptor fusion proteins. *Methods.*, v. **21**, p. 59-66, 2000.
- 54- OCHOA, A.I.S., GALENO, I.C.B., DAZA, P.V. Biología y cultivo del pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Pisces: Arapaimidae): bases para um aproveitamiento sostenible. *Instituto Colombiano de Desarrollo Rural e Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Col.*, p. 109, 2005.
- 55- OLIVEIRA, J.E., MENDONÇA, F., PERONI, C.N., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, v. **787**, p. 345-55, 2003.
- 56- OLIVEIRA, J.E., DAMIANI, R., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography methods for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. *J. Chromatogr. A.*, v. **1164**, p. 206-11, 2007.

- 57- OLIVEIRA, J.E., DAMIANI, R., VORAUER-UHL, K., BARTOLINI, P., RIBELA, M.T.C.P. Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency and glycan structures of recombinant thyrotropin (hTSH) from CHO cells. *Mol. Biotechnol.*, v. **39**, p. 159-66, 2008.
- 58- O'NEILL, D.F., POWELL J.F.F., STANDEN, E.M., YOUSON, J.H., WARBY, C.M., SHERWOOD, N.M. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ancient teleosts, the bonytongue fishes: putative origin of salmon GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. **112**, p. 415-425, 1998.
- 59- PATTERSON, C., ROSEN, D.E. Review of the ichthyodectiform and other mesozoic fishes and the theory and practice of identifying fossils. *B. Am. Museum. Nat. His.*, v. **158**, p. 81–172, 1977.
- 60- PERONI, C.N., SOARES, C.R.J., GIMBO, E., MORGANTI, L., RIBELA, M.T.C.P., BARTOLINI, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. **35**, p. 19-26, 2002.
- 61- PETERSEN, T.N., BRUNAK, S., HEIJNE, G.V., NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.*, v. **8**, p. 785-86, 2011.
- 62- RIBELA, M.T.C.P., GOUT, P.W., BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *J. Chromatogr. B.*, v. **790**, p. 285-316, 2003.
- 63- RIBELA, M.T.C.P., GOUT, P.W., OLIVEIRA, J.E., BARTOLINI, P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. *Curr. Pharm. Anal.*, v. **2**, p. 103-26, 2006.
- 64- ROCH, G.J., WU, S., SHERWOOD, N.M. Hormones and receptors in fish: do duplicates matter? *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. **161**, p. 3-12, 2009.
- 65- SAINT, P.U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: A Review. *Aqua.*, v. **54**, p. 205-40, 1986.
- 66- SHEIN, N.L.M., TAKUSHIMA, M., NAGAE, H., CHUDA, K., SOYANO. Molecular cloning of gonadotropin cDNA in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish. Physiol. Biochem.*, v. **28**, p. 107–8, 2003.

- 67- SHEETS, M.D., OGG, S.C., WICKENS, M.P. Point mutations in AAUAAA and in the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucl. Acids Res.*, v. **18**, p. 5799-05, 1990.
- 68- SO W-K., KWOK H-F., GE, W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits-their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol. Reprod.*, v. **72**, p. 1382-1396, 2005.
- 69- SUZUKI, K., KAWAUCHI, H., NAGAHAMA, Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. **71**, p. 292-301, 1988.
- 70- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, v. **28**, p. 2731-9, 2011.
- 71- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, v. **30**, p. 2725-9, 2013.
- 72- UCHIDA, K., MORIYAMA, S., SOWER, S.A., NOZAKI, M. Glycoprotein hormone in the pituitary of hagfish and its evolutionary implications. *Fish. Physiol. Biochem.*, v. **39**, p. 75-83, 2013.
- 73- VENTINI, D.C., DAMIANI, R., SOUSA, A.P.B., OLIVEIRA, J.E., PERONI, C.N., RIBELA, M.T.C.P., BARTOLINI, P., TONSO, A., SOARES, C.R.J., PEREIRA, C.A. Improved bioprocess with CHO-hTSH cells on higher microcarrier concentration provides higher overall biomass and productivity of r-hTSH. *Appl. Biochem Biotechnol.*, v. **164**, p. 401-9, 2011.
- 74- VISCHER, H.F., GRANNEMAN, J.C., LINSKENS, M.H., SCHULZ, R.W., BOGERD, J. Both recombinant african catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J. Mol. Endocrinol.*, v. **31**, p. 133-40, 2003.
- 75- WELTZIEN, F.A., KOBAYASHI, T., ANDERSSON, E., NORBERG, B., ANDERSEN, O. Molecular characterization and expression of FSH β , LH β and common α -subunit in male Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. **131**, p. 87-96, 2003.

- 76- WWF-BRASIL. *Conservação e Manejo do Pirarucu-Sustentabilidade nos Lagos do Acre*. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.wwf.org.br/29623/Manejo-do-Pirarucu-Sustentabilidade-nos-Lagos-do-Acre>>. Acesso em 4 de agosto de 2014.
- 77- YOSHIURA, Y., KOBAYASHI, M., KATO, Y., AIDA, K. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin β -subunits (GTH-I β and GTH-II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. **105**, p. 379,389, 1997.
- 78- YU, X., LIN, S., KOBAYASHI, M., GE, W. Expression of recombinant zebrafish follicle-stimulating hormone (FSH) in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Fish. Physiol. Biochem.*, v. **36**, p. 273-281, 2010.
- 79- ZHANG, J.G. Morphology and phylogenetic relationships of Kuntulunia (Teleostei: Osteoglossomorpha). *J. Vertebr. Paleontol.*, v. **18**, p. 280-300, 1998.
- 80- ZHOU, L., WANG, Y., YAO, B., LI, C.J., JI, G.D., GUI, J.F. Molecular cloning and expression pattern of 14 kDa apolipoprotein in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, v. **142**, p. 432-7, 2005.
- 81- ZMORA, N., KAZETO, Y., KUMAR, R.S., SCHÜLZ, R.W., TRANT, J.M. Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 *Drosophila* cell line and an indication of their different actions. *J. Endocrinol.*, v. **194**, p. 407-416, 2007.