

AMPLIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL DO GENE MIOSTATINA (*MSTN*) PARA CURIMATÃ (*Prochilodus nigricans*)

Andreza Araujo de Sousa¹; Rairiana Simone Rocha Pereira²; Daniela Rocha Pereira³; Debora Sayumi Doami Melo⁴; Igor Guerreiro Hamoy⁵; André Luiz Alves de Sá⁶.

1. Bolsista PIBIC, Graduando em agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/ISARH, e-mail: andrezaxaraujo@gmail.com; 2. Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/ISARH, e-mail:rairianasrpereira@gmail.com; 3. Mestranda Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/ISARH, e-mail: rocha.daniela.ta@gmail.com; 4. Mestranda em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/ISARH, e-mail: doami2211@gmail.com; 5. Orientador, ISARH/Belém, e-mail: ighamoy@gmail.com; 6. Orientador, ISARH/Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, e-mail: sa.andrealves@gmail.com.

RESUMO:

A pesca se mostra uma das práticas de maior relevância exercidas na Amazônia, sendo fonte de alimento e oportunidade de comércio e renda. A espécie *Prochilodus nigricans*, originária da bacia Amazônica, no entanto foi disseminada, em diversas bacias hidrográficas do Brasil, tendo alta relevância socioambiental para o país. Em peixes, a miostatina (*MSTN*), gene pertencente à superfamília dos fatores de crescimento TGF- β , é expressa em diversos tecidos e órgãos, além de atuar na regulação negativa do desenvolvimento muscular. A RT-qPCR, ferramenta importante para o estudo da expressão gênica, torna possível comparar os níveis de expressão de diferentes genes em amostras biológicas distintas. Sendo assim, este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de RT-qPCR para quantificar a expressão gênica do gene miostatina (*MSTN*) para *P. nigricans*. Foram coletados na fazenda São José no município de Tailândia- PA, 6 animais no início do experimento e 18 animais após 30 dias, nove destes alimentados com dieta controle e outros nove com a dieta contendo torta de dendê. Os animais foram anestesiados via imersão para retirada do tecido muscular e armazenados em 0,8 mL de RNAlaterTM. Foram analisados pares de *primers* com maiores probabilidades de amplificação dos genes a partir da sequência conservadas do *MSTN* em ordem Characiformes, posteriormente sendo realizada uma nova projeção de *primers* específicos para o *P. nigricans*. O RNA foi extraído pelo método Trizol, em triplicata para cada variável, e tratadas com DNase. Após a quantificação do RNA, foi realizada em triplicata, a RT-qPCR para o gene *MSTN*, tendo os genes 18S e GAPDH como endógenos. Todas as reações foram executadas utilizando o CFX96 *TouchTMReal-Time Detection System*. As condições para RT-qPCR foram: transcriptase reversa ativada a 48 °C por 30 minutos, denaturação a 95 °C por 15 minutos, anelamento a 60 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto. Os resultados foram estimados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados foram submetidos para comparação entre tratamentos realizada através do *software* GLM Dunnett PROC, com o auxílio do programa SAS e 0,05 de significância. Com base nos resultados obtidos, identificou-se a ineficácia do *primer* de *MSTN* encontrado na literatura para a espécie *P. nigricans*. Já a sequência dos *primers* *MSTN* projetados para este estudo obteve eficiência para a RT-qPCR. O comportamento da expressão dos genes apresentou distinção no organismo do *P. nigricans* e o tratamento oriundo da torta de dendê obteve uma baixa expressão de miostatina no músculo, exibindo efeitos benéficos no organismo e rendimento muscular do animal. O protocolo desenvolvido de RT-qPCR para espécie *P. nigricans* neste estudo foi bem sucedido.

PALAVRAS-CHAVE: Amazônia; Expressão gênica; RT-qPCR.

¹Link do Vídeo: <https://youtu.be/W48YyejTbOo>