



Realização:



Apoio:



XVII CIC
X ENPOS

Conhecimento sem fronteiras
XVII Congresso de Iniciação Científica
X Encontro de Pós-Graduação
11, 12, 13 e 14 de novembro de 2008

Isolamento de seqüências de cDNA para clonagem do gene da leptina do linguado *Paralichthys orbignyanus*

Autor(es): Adeline Dias Franco, Cristian Kaefer, Breno Xavier Gonçalves, Evelise Sampaio da Silva, Thais Farias Collares, Vinicius Farias Campos, Marta Gonçalves Amaral, Fabiana Kömmling Seixas, João Carlos Deschamps, Tiago Collares

Apresentador: Adeline Dias Franco

Orientador: João Carlos Deschamps

Revisor 1: Luciano da Silva Pinto

Revisor 2: Cláudia Pinho Hartleben Fernandes

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Resumo:

Em mamíferos, a leptina é um dos principais hormônios anorexígenos sintetizada principalmente no tecido adiposo, com funções relacionadas à ingestão de alimento, ao balanço energético e a reprodução. Em peixes, as funções são muito semelhantes, entretanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos para a identificação desta proteína e do gene codificador. Exceto para salmonídeos, uma baixa similaridade na sequência de aminoácidos tem sido observada nos estudos realizados até este momento. Apesar destas diferenças buscou-se neste estudo isolar fragmentos de cDNA correspondentes ao gene da leptina do *P. orbignyanus*. Neste estudo dois animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta do fígado que imediatamente após sua retirada foi armazenado em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total a qual foi realizada com o reagente TRIzol® (Invitrogen®, USA) de acordo com instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado com o fluorômetro Qubit™ (Invitrogen®, USA) para a posterior confecção do cDNA. O cDNA foi sintetizado com a enzima SuperScript III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen®, USA) de acordo com instruções do fabricante. Uma reação de RT-PCR para amplificação do gene housekeeping da beta-actina foi realizada para a confirmação da síntese de cDNA. Com os primers construídos a partir de outras seqüências, disponíveis no GenBank e correspondentes à leptina, foram realizadas reações de RT-PCR com as seguintes condições: 94°C – 30 segundos, 50°C – 30 segundos e 72°C – 1 minuto. Foram amplificados dois fragmentos: um com 200 pb e outro com 400 pb. Estes fragmentos foram purificados e clonados no vetor pCR®4-TOPO® para o seqüenciamento que foi realizado no seqüenciador automático MegaBace 500 DNA sequencer (Amersham Biosciences, USA). Os clones seqüenciados não corresponderam à leptina baseado no Blast com as seqüências disponíveis no GenBank. Este resultado em parte negativo vem a comprovar que as seqüências de leptina possuem uma similaridade muito baixa, como reportado em outros estudos. Estas seqüências estão em processo de depósito no GenBank em forma de EST contribuindo para posteriores estudos envolvendo bibliotecas de cDNA. Neste sentido, alternativas estão sendo, como o isolamento da proteína para identificação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massa e posterior clonagem do gene.