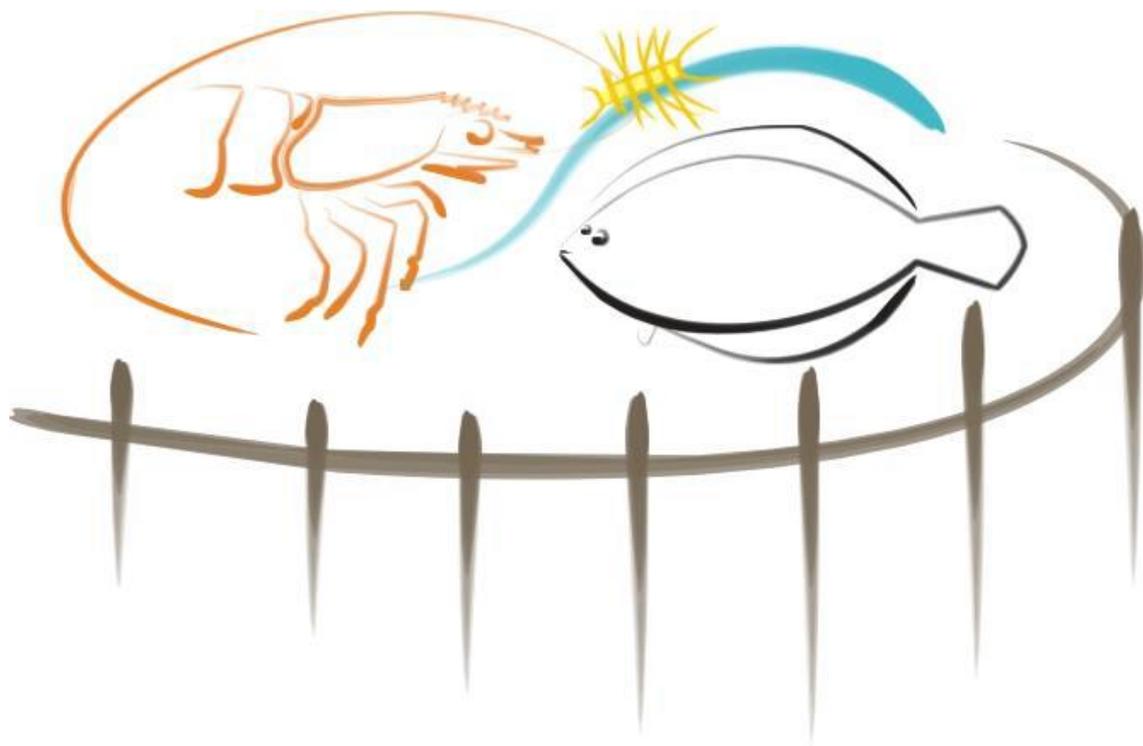




**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**  
**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



**NOVA VARIANTE DA PROTEÍNA FLUORESCENTE DSRED2 COM  
POTENCIAL APLICAÇÃO NA PISCICULTURA ORNAMENTAL**

**NATALIA OSSA HERNÁNDEZ**

**RIO GRANDE, RS  
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**Nova variante da proteína fluorescente DsRed2 com potencial aplicação na piscicultura ornamental**

**Natalia Ossa Hernández**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de **MESTRE** em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Co-orientadora: Dra. Daniela Volcan Almeida

**RIO GRANDE, RS**  
**Março/ 2016**

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                                     | 5  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                                     | 6  |
| <b>DEDICATÓRIA</b> .....  | 8  |
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....                                       | 9  |
| <b>AGRADECIMIENTOS (ESPAÑOL)</b> .....                            | 11 |
| <b>RESUMO</b> .....   | 13 |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 14 |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 15 |
| 1.1 <i>Zebrafish</i> como modelo de estudo .....                  | 18 |
| 1.2 Proteínas fluorescentes (PF) .....                            | 20 |
| 1.3 <i>Error-prone</i> PCR (epPCR) para mutagênese randômica..... | 25 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 27 |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 27 |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                  | 27 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                | 28 |
| 3.1 Biossegurança e Comissão de Ética no Uso de Animais.....      | 28 |
| 3.2 Obtenção das proteínas variantes: mutagênese randômica.....   | 28 |
| 3.3 Transformação bacteriana.....                                 | 29 |
| 3.4 Colônias bacterianas transformadas.....                       | 30 |
| 3.5 Sequenciamento.....   | 30 |
| 3.6 Construções genéticas para purificação das proteínas .....    | 30 |
| 3.7 Transformação bacteriana.....                                 | 32 |
| 3.8 Expressão e purificação da proteína .....                     | 32 |
| 3.8.1 Purificação da proteína .....                               | 33 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.8.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) ..... | 33        |
| 3.9 Análise espectral das mutantes .....                                  | 33        |
| 3.10 Medição da cinética de maturação .....                               | 33        |
| 3.11 Peixes transgênicos fluorescentes .....                              | 34        |
| 3.11.1 Construção genética .....  | 34        |
| 3.11.2 Manutenção dos peixes .....  | 35        |
| 3.11.3 Obtenção dos ovos para microinjeção .....                          | 35        |
| 3.11.4 Produção de peixes transgênicos .....                              | 36        |
| 3.11.5 Manutenção dos ovos.....   | 36        |
| 3.11.6 Verificação da transgenia e seleção de positivos (geração F0)..... | 37        |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....  | <b>38</b> |
| 4.1 Proteínas mutantes .....  | 38        |
| 4.2 Purificação da proteína .....   | 40        |
| 4.2.1 SDS-PAGE .....  | 41        |
| 4.3 Análise espectral da proteína mutante .....                           | 42        |
| 4.4 Cinética da maturação.....  | 44        |
| 4.5 Peixes transgênicos .....   | 45        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>7. PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                | <b>53</b> |
| <b>9. ANEXOS</b> .....  | <b>69</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1-</b> Parâmetros de qualidade da água adequados para o cultivo de <i>zebrafish</i> ( <i>Danio rerio</i> ). ..... | 18 |
| <b>Tabela 2-</b> Oligonucleotídeos utilizados na reação de mutagênese randômica.....  | 29 |
| <b>Tabela 3-</b> Oligonucleotídeos utilizados para reações de sequenciamento .....  | 30 |
| <b>Tabela 4-</b> Oligonucleotídeos usados para construções genéticas para purificação das proteínas.....                    | 31 |
| <b>Tabela 5-</b> Oligonucleotídeos usados para construção do fragmento linear pxxxxx. ....                                  | 34 |
| <b>Tabela 6-</b> Alterações de aminoácidos encontrados nas variantes fluorescentes .....                                    | 38 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1-</b> Principais etapas para a obtenção de peixes transgênicos fluorescentes.. .....   | 16 |
| <b>Figura 2-</b> Peixes Glofish ( <i>Danio rerio</i> ) disponíveis comercialmente.....  | 17 |
| <b>Figura 3-</b> Peixes modificados geneticamente através da inserção de proteínas fluorescentes. ....  | 17 |
| <b>Figura 4-</b> Eventos representativos do desenvolvimento do <i>zebrafish</i> .....   | 18 |
| <b>Figura 5-</b> Gráfico representativo do número de publicações incluindo o termo proteínas fluorescentes e proteínas vermelhas fluorescentes desde 1958 até 2013..... | 22 |
| <b>Figura 6-</b> Mecanismo de formação do cromóforo na proteína DsRed. ....   | 24 |
| <b>Figura 7-</b> Mutagênese randômica por <i>error-prone</i> PCR (epPCR).. ....   | 26 |
| <b>Figura 8-</b> Esquema representativo para a produção do vetor contendo o gene <i>DsRed2</i> mutado.. ....  | 29 |
| <b>Figura 9-</b> Representação esquemática da clonagem circular por extensão da polimerase (CPEC).....  | 31 |
| <b>Figura 10-</b> Fragmento linear xxxxxxxx.....  | 35 |
| <b>Figura 11-</b> Síntese das principais etapas para a produção de peixes transgênicos.. .....  | 36 |
| <b>Figura 12-</b> Alinhamento de aminoácidos das proteínas DsRed2, mutante #6, mutante #7, e mutante # 10. ....   | 39 |
| <b>Figura 13-</b> Colônias de <i>E. coli</i> transformadas com as variantes da proteína vermelha fluorescente.....  | 39 |
| <b>Figura 14-</b> Imagens do microscópio de fluorescência das colônias expressando as proteínas fluorescentes.....  | 40 |
| <b>Figura 15-</b> Proteínas DsRed2 (controle) e mutante #10.. ....  | 41 |
| <b>Figura 16-</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). ....   | 42 |

**Figura 17-** Espectro de emissão e excitação para a proteína mutante #10 e a proteína DsRed2..... 43

**Figura 18-** Cinética da maturação das proteínas..... 45

**Figura 19-** Larvas de peixes *zebrafish* transgênicos expressando a proteína mutante #10.  
..... 46

*Sin ustedes nada de esto tendría sentido. A mi madre Alba Nora y mi padre Hernán,  
mis hermanos Harold y Sebastian.*  
**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à vida... por ter me dado a virtude de sonhar e o prazer de viver minha vida junto a grandes pessoas. As quais hoje eu quero agradecer!

A minha **FAMÍLIA**, agradeço minhas tias, tios, primos, primas, avôs e avós, pelo apoio, força, carinho. Obrigada por terem acreditado em mim e no que eu posso alcançar. Especialmente, agradeço cinco pessoas que são a luz que iluminam minha vida. Meus pais **Nora** e **Hernán**, meus irmãos **Harold** e **Sebastian** e meu avô **Elias**. Vocês são aquela força, aquela vontade de lutar pelos sonhos, aquele sorriso e paz que é necessário para ser feliz. Obrigada por nunca me deixarem desistir e continuarem do meu lado em cada passo que eu dou. Vocês são a minha fonte de inspiração e de perseverança. Obrigada por sempre me deixar escolher o rumo dos meus passos e me apoiar em cada decisão que tomei. Graças a seu apoio decidi me tornar uma profissional, e nesse caminho, a vida colocou ao meu passo grandes pessoas das quais aprendi muito. Obrigada Professora **Luz Elena** por ter me ensinado a me apaixonar pelo mundo do DNA. Foi você quem me fez entender qual era a profissão que queria seguir. Obrigada por ter me apresentado a oportunidade de continuar neste caminho. Já dizia Walt Disney *Se você pode sonhar com algo você pode fazê-lo*. Foi então que sonhei em me tornar Mestre. Sendo a hora de agradecer ao **Governo Brasileiro, à CAPES, ao CNPq, à FURG, ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura (incluindo professores e colegas) e à UFRJ**, por ter me oferecido a oportunidade, o recurso e o conhecimento para seguir meu caminho. A decisão de me tornar mestre, teve mais um objetivo, conhecer e trabalhar com a pessoa por quem tenho uma **admiração absoluta**, um ser humano e profissional incrível, o meu orientador **Dr. Luis Fernando Marins**. Obrigada professor Luf por estes dois anos de tanto conhecimento, otimismo e força. Sei que tomei a decisão certa e escolhi a melhor pessoa para me orientar nesta luta. Serei grata a você sempre, e como já lhe falei um dia, hoje eu repito, eu quero ser uma profissional igual a você! Junto a ele um grupo de pessoas maravilhosas que me ensinaram, acompanharam e apoiaram incondicionalmente. **Daniela, Frederico e Márcio** obrigada pelo exemplo de pessoas e profissionais, pelo carinho, sabedoria, obrigada por tantos conselhos, palavras e ensinamentos que levarei comigo pelo resto da vida. Pessoal da sala 4, **Cecília, Bruna, Liane, Bruno, Cássia, Kamila, Maiara, Leonardo, Stefani, Jade, Guilherme, Jéssica, Marcella, João** de cada um de vocês levo um pedacinho, uma palavra, um apoio, um abraço que ficará para

sempre no meu coração e que apesar de ter sido tão difícil chegar até o fim dessa etapa, a vida colocou vocês no meu caminho para me encher de risadas, momentos e abraços que jamais esquecerei. Obrigada por tudo! Falta uma pessoa, alguém que me ensinou que a vida vai sempre te surpreender. **Raíza** obrigada, por tantas brigas, discussões, bipolaridades, fofocas, risadas, mimos, obrigada por me ensinar que de quem pouco esperas é quem mais pode te oferecer. Você e o **Manuel** fizeram que este caminho sempre tivesse um gostinho diferente, Obrigada! A todos vocês devo tantas risadas, painéis de discussão, abraços e momentos que me ensinaram que a vida vai ser sempre isso: Um conjunto de incertezas que temos que aprender a viver. Também agradeço ao professor **Dr. Rodrigo Volcan Almeida e sua família** por ter nos acolhido, ao pessoal do **Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas (LaMMP)** da UFRJ, pela ajuda, o espaço e o conhecimento necessário para concluir nosso trabalho, Obrigada. A **Carolina e Stevens**, sei que não foi fácil me aguentar estes dois anos, mas vocês o conseguiram. Muito brigada por tudo!! Não posso desaproveitar este espaço para dizer a três pessoas maravilhosas, que possivelmente somente em vários anos conseguiram saber o quanto sou grata a eles, **Joana, Gael e Samuel**, os anjos desta história, o olhar mais puro e o sorriso mais sincero. Obrigada por ter me lembrado o quanto ser criança é bom, obrigada por tantas risadas puras, vocês talvez não saibam o que fizeram, mas eu sei que nos momentos mais escuros, sua luz brilhava para mim lembrar a escolhia que fiz e o caminho que quero seguir. Obrigada pessoinhas lindas. **Valentina e Felipe**, colegas da vida e de DNA, têm sido 7 anos cheios de tantas coisas, que agora só me resta falar Obrigada por continuar aí. Finalmente, agradeço à banca, por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho que tanto conhecimento me ofereceu!

A longa trajetória de mais um sonho que foi concluído e que não vai parar aqui! De novo Muito obrigada **VIDA**, Muito obrigada **VOCÊS TODOS**, e quem não mencionei, mas também fez parte desta longa caminhada, ao Brasil e a Colômbia **MUITO OBRIGADA!!**

## **AGRADECIMIENTOS (ESPAÑOL)**

Le agradezco a la vida por haberme dado la virtud de soñar y el placer de vivir mi vida junto a grandes personas. ¡A las cuales les quiero agradecer!

A mi **FAMÍLIA**, les agradezco a mis tías, tíos, primos, primas, abuelitas y abuelitos por el apoyo, la fuerza y el cariño. Gracias por creer en mí y en lo que puedo alcanzar. Especialmente, agradezco a cinco personas que son la luz que ilumina mi vida. **Mis padres Nora y Hernán, mis Hermanos Harold y Sebastian y mi abuelito Elías.** Ustedes son mi fuerza, mi voluntad de luchar por los sueños, son la sonrisa y la paz que es necesaria para ser feliz. Gracias por no dejarme desistir y continuar a mi lado en cada paso que doy. Ustedes son mi fuente de inspiración y perseverancia. Gracias por dejarme escoger el rumbo de mis pasos y por apoyarme en cada decisión que he tomado. Gracias a su apoyo decidí ser una profesional y en ese camino, la vida colocó a mi paso grandes personas de las cuales he aprendido mucho. Gracias profesora **Luz Elena** por enseñarme la pasión por el mundo del **ADN**. Fue usted quien me hizo entender cuál era la profesión que quería seguir. Gracias por haberme presentado la oportunidad de continuar en este camino. Ya decía Walt Disney *Si usted lo puede soñar usted lo puede lograr*. Fue entonces cuando decidí convertirme en Magister, siendo el momento de agradecer a el **Gobierno Brasileiro, a la CAPES, CNPq, a la FURG, a el programa de Post Graduación en Acuicultura (incluyendo profesores y compañeros) y a la UFRJ**, por haberme ofrecido la oportunidad, el recurso y el conocimiento para seguir mi camino. La decisión de convertirme en magister tuvo también otro objetivo, conocer y trabajar con un profesor al que le tengo una **admiración absoluta**, un ser humano y profesional increíble, mi director el **Dr. Luis Fernando Marins**. Muchas gracias profesor Luf por estos dos años de tanto conocimiento, optimismo y fuerza. Sé que tomé la decisión correcta y escogí la mejor persona para orientarme en esta lucha. ¡Estaré muy agradecida con usted siempre! y como una vez sé lo hice saber, hoy lo repito, Yo quiero ser una profesional igual a usted. Junto a él, un grupo de personas maravillosas que me enseñaron, acompañaron y apoyaron incondicionalmente. **Daniela, Frederico y Marcio** muchas gracias por el ejemplo de personas y profesionales, por el cariño, sabiduría, gracias por tantos consejos, palabras y enseñanzas que llevaré conmigo por el resto de la vida. Personal de la sala 4 **Cecília, Bruna, Liane, Bruno, Cássia, Kamila, Maiara, Leonardo, Stefani, Jade, Guilherme, Jéssica, Marcella, João**, de cada uno de ustedes

me llevo un pedacito, una palabra, el apoyo, un abrazo que quedará siempre en mi corazón y que a pesar de haber sido tan difícil llegar hasta el final de esta etapa, la vida los colocó a ustedes en mi camino para llenarme de risas, momentos y abrazos que jamás olvidaré. ¡Muchas gracias por todo! Falta una persona que me enseñó que la vida siempre te va a sorprender. **Raíza**, gracias por tantas peleas, discusiones, bipolaridades, chismes, risas, cariño, gracias por enseñarme que de quien poco se espera es quien más puede ofrecer. Usted y **Manuel** hicieron que este camino siempre tuviera un sabor diferente ¡Gracias! A todos ustedes debo tantas risas, paneles de discusión, abrazos, enseñanzas que me hicieron entender que la vida siempre será eso: un conjunto de incertidumbres que tenemos que aprender a vivir. También agradezco al profesor **Dr. Rodrigo Volcan Almeida y su familia** por habernos acogido, al **Laboratorio de Microbiología Molecular y Proteínas (LaMMP) de la UFRJ**, por habernos ofrecido la ayuda, el espacio y el conocimiento necesario para concluir nuestro trabajo. ¡Muchas gracias! A **Carolina y Stevens**, sé que no fue fácil aguantarme estos dos años, pero ustedes lo lograron, Gracias por todo. No puedo desaprovechar este espacio para decirle a tres personas maravillosas, que posiblemente solo en varios años lograrán entender cuanto les agradezco. **Joana, Gael y Samuel**, los ángeles de esta historia, con su mirada tan pura y su sonrisa tan sincera. Gracias por haberme recordado como es bueno ser niño, gracias por tantas risas puras, así ustedes no lo sepan, en los momentos más oscuros su luz brillaba para recordarme la elección que hice y el camino que debo seguir. Gracias personas lindas. **Valentina y Felipe**, compañeros de vida e ADN gracias, han sido 7 años llenos de tantas cosas, que sólo me resta decirles ¡Gracias por tanto! Finalmente agradezco a los evaluadores, por haber aceptado la invitación para evaluar este trabajo que tanto conocimiento me ofreció.

El largo camino de un sueño que concluyó pero que no va parar aquí, de nuevo muchas gracias **VIDA**, muchas gracias a **TODOS USTEDES**, y a quién no mencioné pero también hizo parte de esta gran caminata, a Brasil y a Colombia ¡**MUCHAS GRACIAS!!**

## RESUMO

A rentabilidade econômica gerada pela aquicultura ornamental a torna um dos importantes componentes da indústria aquícola. O aumento da demanda de peixes ornamentais gera a necessidade da utilização de técnicas que permitam a produção de novas variedades. Neste cenário, genes codificantes para proteínas fluorescentes têm sido inseridos com êxito no genoma de diversas espécies de peixes, gerando novas variedades ornamentais. Porém, a disponibilidade de proteínas fluorescentes no mercado é limitada. Desse modo, este trabalho teve como objetivo desenvolver novas variantes de proteínas fluorescentes para aplicação na aquicultura ornamental. Para isso, o gene *DsRed2* que codifica para a proteína vermelha fluorescente do coral *Discosoma* sp. foi utilizado como base para a produção de novas variantes através de mutagênese randômica induzida por *error-prone* PCR (epPCR). Um total de 12 genes variantes foram isolados, sequenciados e analisados. A variante denominada Mutante #10 apresentou alterações interessantes nas suas propriedades espectrais, possuindo xxxx emissão de fluorescência quando excitada nos comprimentos de onda de xxx e xxxxx nm, respectivamente. Esta nova variante foi expressa em *Escherichia coli* e também no tecido muscular do *zebrafish* (*Danio rerio*), apresentando a xxxxxx emissão de fluorescência em ambos modelos. Uma proteína com xxxxx emissão de fluorescência pode ter aplicações em diversas áreas, desde as ciências básicas até a aquicultura ornamental.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aquicultura ornamental, error-prone PCR, mutagênese randômica, proteínas fluorescentes, transgênese, zebrafish.*

## **ABSTRACT**

The economic profitability generated by ornamental aquaculture makes it one of the important components of the aquaculture industry. The increased demand for ornamental fish generates the need to use techniques that permit the production of new varieties. In this scenario, genes encoding fluorescent proteins have been successfully inserted into the genome of several species of fish, generating new ornamental varieties. However, the availability of fluorescent proteins in the market is limited. Thus, this study aimed to develop new variants of fluorescent proteins for use in ornamental aquaculture. For this, the *DsRed2* gene encoding the red fluorescent protein from coral *Discosoma* sp. was used as the basis for production of new variants by random mutagenesis induced by *error-prone* PCR (epPCR). A total of 12 gene variants were isolated, sequenced and analyzed. The variant named Mutante #10 showed interesting changes in its spectral properties, having xxxx fluorescence emission, when excited at wavelengths of xxx and xxx nm, respectively. This new variant was expressed in *Escherichia coli* and in the muscle tissue of zebrafish (*Danio rerio*), with xxxx fluorescence emission in both models. A protein with xxxx fluorescence emission may have applications in various fields, ranging from basic sciences to the ornamental aquaculture.

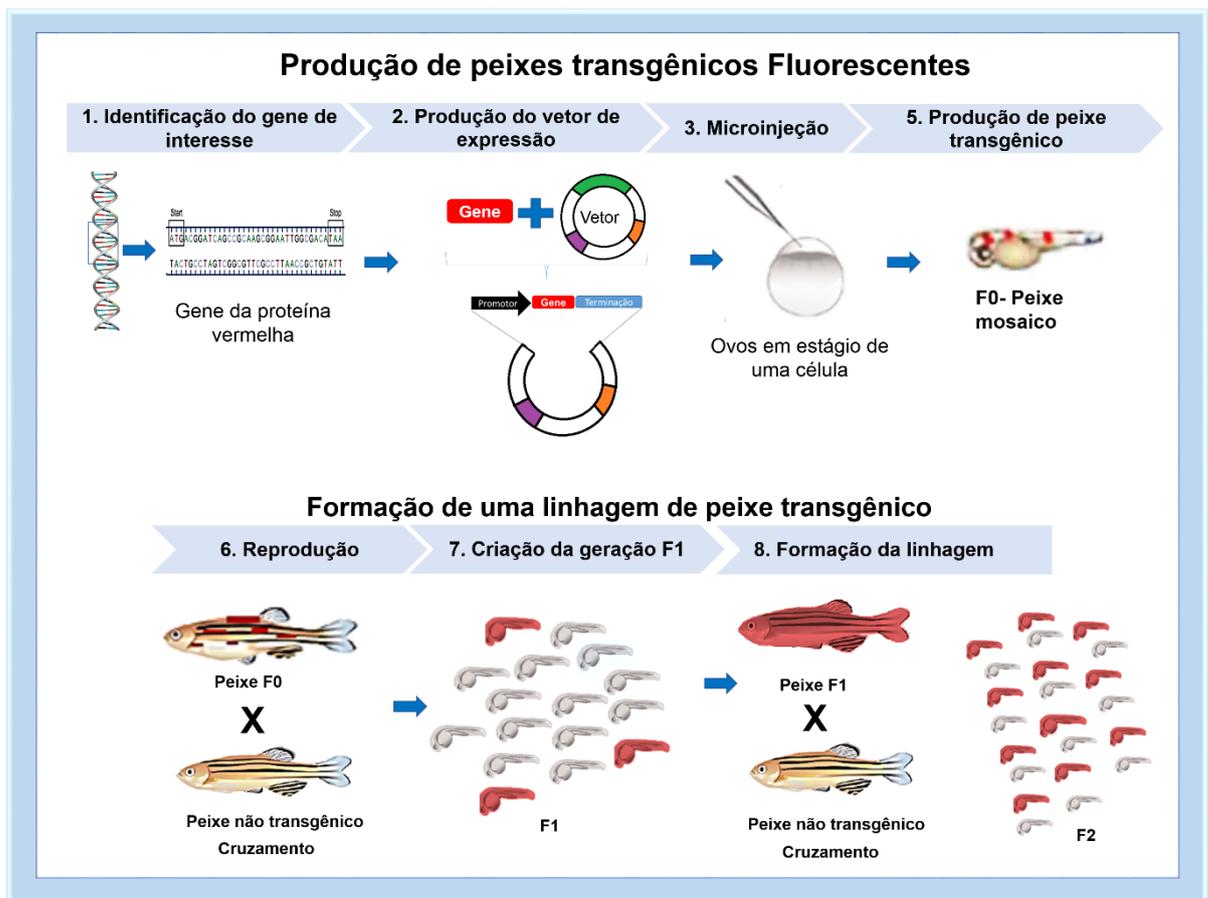
**KEYWORDS:** *Error-prone PCR, fluorescent proteins, ornamental aquaculture, random mutagenesis, transgenesis, zebrafish.*

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de organismos aquáticos para fins ornamentais surgiu com os antigos egípcios que criavam peixes em aquários por razões místicas. Posteriormente, esta prática foi desenvolvida na China entre os anos de 970 a 1279, sendo baseada na criação de peixes ornamentais tais como as carpas *Carassius auratus* e *Cyprinus carpio koi*. Devido ao sucesso na criação desses organismos, a China tornou-se o primeiro país a exportar peixes para o Japão. Em seguida, a aquicultura ornamental chegou à Europa no século XVII, à América do Norte no século XVIII e ao Brasil no final do século XIX (Magalhães *et al.* 2009, Reynoso *et al.* 2012).

A aquicultura ornamental é um setor que vem ganhando grande popularidade no mundo, com um crescimento anual médio de 14% desde 1985 (Bartley 2005, Zuanon *et al.* 2011). É considerada uma atividade de grande importância econômica, pois movimentava cerca de 1 bilhão de dólares por ano. O Brasil se destaca como grande exportador na América do Sul sendo que, em 2008, exportou o recorde de 41 milhões de peixes ornamentais (Ploeg 2013, SECEX 2016). Em 2014, o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) realizou mudanças na legislação brasileira (Instrução normativa nº 16, de 11 de agosto de 2014), com a finalidade de manter o Brasil entre os países líderes em produção e exportação de peixes ornamentais, assegurando que, o país movimentava cerca de 350 a 400 milhões de exemplares por ano (MPA 2014). Porém, essa atividade pode se desenvolver ainda mais, com a implementação de novas tecnologias na produção de peixes ornamentais, o que acrescentaria um lucro econômico maior no mercado brasileiro (ABLA 2016).

O aumento da demanda de peixes ornamentais gera a necessidade da utilização de técnicas que permitam a produção de novos atrativos (Melamed *et al.* 2002). Uma das técnicas já implementadas na aquicultura ornamental é a transgenia, a qual consiste na modificação genética de um determinado organismo através da inserção de genes exógenos e, deleção ou alteração de expressão de genes endógenos, com o intuito de melhorar ou alterar as características de interesse (Yount 2008). Dentro da aquicultura esta técnica permitiu a produção de peixes transgênicos fluorescentes (Figura 1), que foram recentemente introduzidos no mercado da aquicultura ornamental.



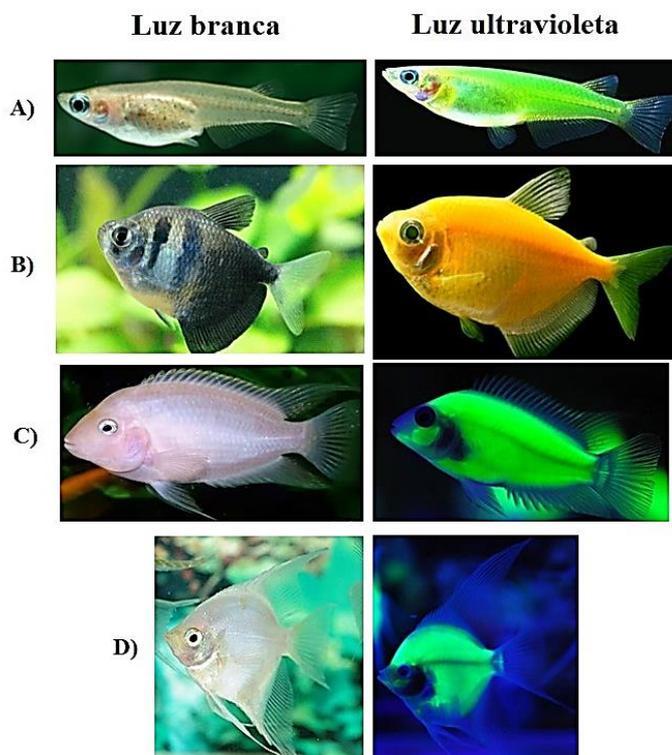
**Figura 1-** Principais etapas para a obtenção de peixes transgênicos fluorescentes. Modificado de Lanes *et al.* (2014).

Os primeiros peixes transgênicos para fins ornamentais foram produzidos em 2003 por Gong e colaboradores, os quais manipularam geneticamente o *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton 1822) através da inserção da proteína vermelha fluorescente (DsRed) sob o controle de um promotor específico de músculo. Estes peixes foram considerados adequados para a ornamentação, devido à possível visualização de fluorescência, sem a utilização de radiação UV (Zhu & Zon 2004). Deste modo, *zebrafish* ornamentais expressando proteínas fluorescentes (PF) são hoje conhecidos como Glofish (Figura 2), e são comercializados em diversos países como os Estados Unidos, Malásia, Taiwan, Hong Kong (Niemann & Kues 2007).



**Figura 2-** Peixes Glofish (*Danio rerio*) disponíveis comercialmente. (Fonte: Glofish Website, <https://www.glofish.com/>).

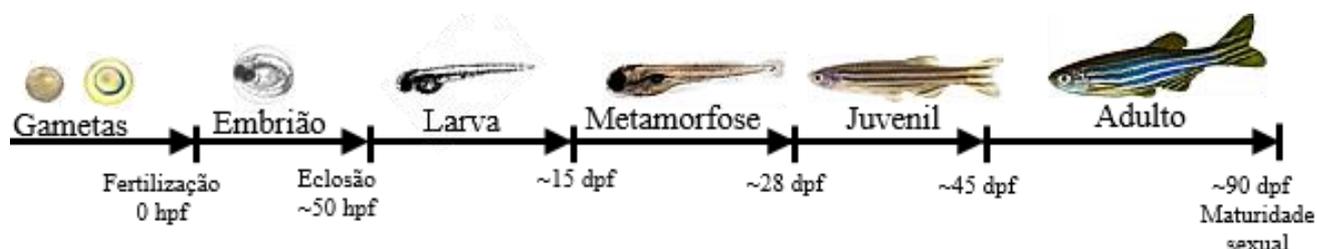
De acordo com Gong *et al.* (2003), peixes ornamentais transgênicos são uma alternativa que tem grande aceitação no mercado de organismos ornamentais, ajudando a suprir as demandas da aquariorfilia. Além do *zebrafish*, vários peixes fluorescentes têm sido produzidos com o auxílio da transgenia, tais como: o medaka (*Oryzias latipes*) (Chou *et al.* 2001), o tetra preto (*Gymnocorymbus ternetzi*) (Pan *et al.* 2008), o *Pterophyllum scalare* e *Amatitlania nigrofasciata* (Jy Lin Trading Co., Ltda. Website, <http://www.ornamentalfish.com>) (Figura 3).



**Figura 3-** Peixes modificados geneticamente através da inserção de proteínas fluorescentes. **A)** medaka (*Oryzias latipes*) (Chou *et al.* 2001), **B)** tetra preto (*Gymnocorymbus ternetzi*) (Pan *et al.* 2008), **C)** *Amatitlania nigrofasciata* e **D)** *Pterophyllum scalare* (Fonte: Jy Lin Trading Co., Ltda Website, <http://www.ornamentalfish.com>. Expostos a luz branca e luz ultravioleta.

## 1.1 *Zebrafish* como modelo de estudo

O *zebrafish* (Cypriniformes, Cyprinidae) tem sido empregado como um modelo para estudos em diversas áreas, incluindo a aquicultura (Dahm & Geisler 2006, Ribas & Piferrer 2013, Ulloa *et al.* 2014). Devido aos baixos custos de manutenção, pequeno espaço necessário para o cultivo, rápido ciclo de gerações, embriões resistentes para manipulações experimentais (p. ex. microinjeção e experimentos celulares de transplante), desenvolvimento rápido e bem caracterizado (Figura 4), (a embriogênese leva apenas cerca de 24 h e a organogênese é em grande parte concluída após o dia 5 do desenvolvimento), grande número de descendentes e ovos com córion relativamente fino e translúcido (Udvardia & Linney 2003, Lawrence 2007).



**Figura 4-** Eventos representativos do desenvolvimento do *zebrafish*. Diferentes estágios do desenvolvimento são mostrados, desde a fertilização até a fase adulta. Hpf: horas após a fecundação; dpf: dias após a fertilização. Modificado de Ribas & Piferrer (2013) e Dahm & Geisler (2006).

O *zebrafish* é muito utilizado como peixe ornamental devido à tolerância a variações nos parâmetros da qualidade da água e a facilidade com que pode ser reproduzido e mantido em cativeiro. Além disso, as condições adequadas de cultivo (Tabela 1) para um ótimo crescimento e desenvolvimento do *zebrafish* têm sido estabelecidas (Dammski *et al.* 2011).

**Tabela 1-** Parâmetros de qualidade da água adequados para o cultivo de *zebrafish* (*Danio rerio*). Modificado de (Dammski *et al.* 2011).

| Parâmetro           | Níveis adequados | Frequência do teste |
|---------------------|------------------|---------------------|
| pH                  | 6,8 - 8,5        | Diariamente         |
| Temperatura         | 24 - 28°C        | Diariamente         |
| Amônia total        | Até 0,25 mg/L    | Semanalmente        |
| Nítrito             | Até 0,25 mg/L    | Semanalmente        |
| Nitrato             | Até 200 mg/L     | Semanalmente        |
| Alcalinidade        | 50 - 100 mg/L    | Mensalmente         |
| Oxigênio dissolvido | Acima de 4 mg/L  | Mensalmente         |

Desta forma, o conhecimento sobre a sequência total do genoma, o desenvolvimento embrionário e a facilidade de manipulação genética do *zebrafish*, o torna um dos mais importantes modelos de organismos vertebrados usados para pesquisa biológica.

No Brasil, no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) foram desenvolvidas duas linhagens de peixe *Danio rerio* transgênico (Figueiredo *et al.* 2007, Figueiredo *et al.* 2012) e uma linhagem de duplo transgênico (Silva *et al.* 2015). Embora estas linhagens não tenham sido criadas para fins ornamentais, sua produção evidencia a eficácia da tecnologia da transgênese e o domínio das metodologias de manipulação genética por laboratórios do país.

Figueiredo *et al.* (2007), produziram um modelo de *zebrafish* transgênico, caracterizado pela super-expressão do hormônio do crescimento (GH). Este modelo foi desenvolvido usando dois transgenes: um contendo o promotor da  $\beta$ -actina dirigindo a expressão da proteína verde fluorescente (GFP) da medusa *Aequorea victoria* e o segundo contendo o promotor da  $\beta$ -actina dirigindo a expressão do gene do hormônio de crescimento do peixe-rei marinho *Odonthestes argentinensis*. Posteriormente, Figueiredo *et al.* (2012), desenvolveram um modelo de *zebrafish* transgênico caracterizado pela super-expressão do receptor do hormônio do crescimento (GHR) junto com a proteína vermelha fluorescente desestabilizada (DsRed-DR). Silva *et al.* (2015), desenvolveram a primeira linhagem de *zebrafish* duplo transgênico, caracterizado pela super-expressão concomitante do hormônio do crescimento e do receptor do hormônio do crescimento.

A aplicação de técnicas de manipulação genética para a produção de peixes ornamentais geneticamente modificados pode contribuir no aumento de possibilidades na aquariofilia, uma vez que o sucesso na comercialização de peixes ornamentais depende de características atrativas como a cor (Rao *et al.* 2013). Não é por acaso que o peixe ornamental mais exportado pelo Brasil é o tetra neon cardinal (*Paracheirodon axelrodi*), o qual apresenta fluorescência natural (Ribeiro *et al.* 2010) e reforça a vantagem econômica dos peixes ornamentais fluorescentes.

Para a produção de peixes ornamentais fluorescentes, existem algumas limitações. Por exemplo, a disponibilidade de novas variantes de proteínas fluorescentes ainda é limitada, considerando que a acessibilidade é normalmente restrita aos laboratórios nos quais são produzidas (Shaner *et al.* 2007), ou protegidas por patente. Assim, o

desenvolvimento de novas proteínas fluorescentes pode ser uma alternativa para contornar esse obstáculo e, conseqüentemente, viabilizar a produção de novas linhagens de peixes transgênicos ornamentais.

## 1.2 Proteínas fluorescentes (PF)

Proteínas são polímeros de aminoácidos, nos quais cada resíduo de aminoácido se liga ao outro através de um tipo específico de ligação covalente. As proteínas representam as macromoléculas mais abundantes nas células vivas (Lehninger & Cox 2006). Dentre o grupo das proteínas, as proteínas fluorescentes são aquelas que compartilham a mesma estrutura terciária barril beta ( $\beta$ ) formada por 11 cadeias, com um segmento central alfa ( $\alpha$ ) helicoidal, que contém o cromóforo (estrutura da molécula responsável pela cor). O cromóforo é formado através de modificação auto catalítica do esqueleto peptídico em um motivo XYG invariante, que conduz a um sistema conjugado *pi* ( $\pi$ ) prolongado, com níveis de energia do estado excitado, o qual encontram-se dentro do espectro de luz visível. O cromóforo das proteínas fluorescentes compartilha o mesmo núcleo imidazolinônico (4-(p-hidroxibencilideno)imidazolidin-5-ona), diferindo apenas em seus substituintes (Shaner 2014). Em grande parte, a extensão da conjugação no cromóforo maduro (o único pré-requisito para a maturação do cromóforo é o correto dobramento da proteína) determina os comprimentos de onda de excitação e de emissão. Portanto, um maior grau de conjugação leva a maiores comprimentos de onda (Stepanenko *et al.* 2013). Assim, as maiores variações no comprimento de onda das proteínas fluorescentes provêm de variações na estrutura do cromóforo. Dessa forma, substituições de aminoácidos ao redor do cromóforo frequentemente influenciam nas propriedades ópticas da proteína mutante resultante (Shaner 2014).

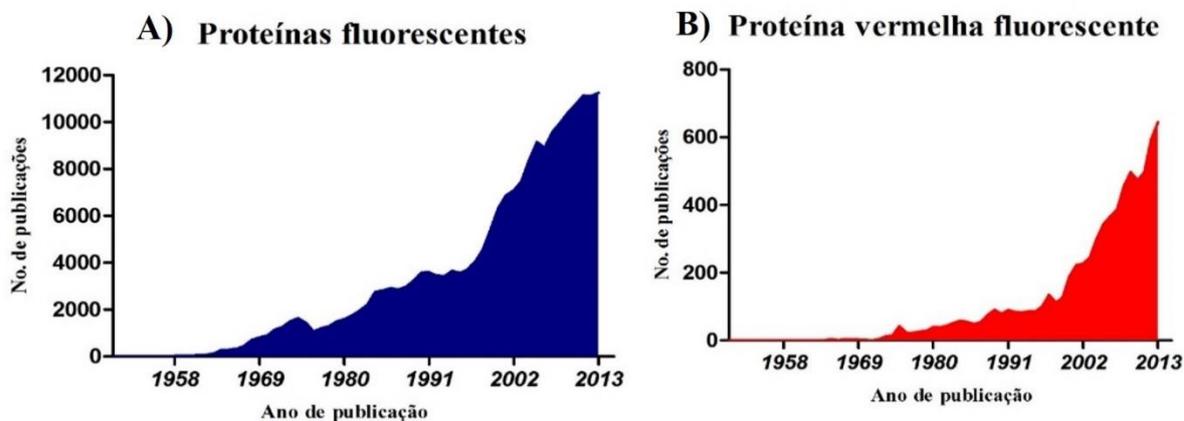
As proteínas fluorescentes podem ser aplicadas em uma grande variedade de estudos (p. ex. marcar células inteiras, visualizar proteínas individuais e as interações com outras proteínas, e realizar imagens em tempo real das biomoléculas em células vivas) e suas aplicações continuam se expandindo (Chudakov *et al.* 2010, Jones *et al.* 2012, Bansal *et al.* 2013, Shen *et al.* 2015). A principal vantagem do uso das PF em comparação com os corantes sintéticos é que as proteínas fluorescentes podem ser geneticamente introduzidas em células, tecidos ou organismos inteiros (Stepanenko *et al.* 2013).

O marco da utilização de proteínas fluorescentes teve início em 1992, quando Prasher e colaboradores, elucidaram a estrutura primária da proteína verde fluorescente (GFP, do

inglês *green fluorescent protein*, primeira proteína fluorescente descoberta), isolada da medusa *Aequorea victoria*, ganhando ainda mais atenção quando foi demonstrada pela primeira vez sua utilidade como um marcador fluorescente *in vivo* (Chalfie *et al.* 1994). Desde então, a GFP tornou-se a ferramenta que possibilita a direta visualização de estruturas e processos em células e organismos vivos (Chudakov *et al.* 2010).

Depois do sucesso na utilização da GFP como marcador *in vivo*, começou-se a investir na engenharia das proteínas fluorescentes a fim de aumentar e melhorar a escala de cores de proteínas fluorescentes. Além disso, a natureza mostrou-se uma fonte de proteínas fluorescentes novas. Em 1999, Matz e colaboradores isolaram de recifes de coral e anêmonas marinhas, proteínas fluorescentes homólogas à GFP, como ciano (AmCyan) do coral *Anemonia majano*, amarela (ZsYellow) e verde (ZsGreen) do coral *Zoanthus* sp., e vermelha (DsRed) do coral *Discosoma* sp. Este fato, levou à procura de novas fontes de proteínas fluorescentes naturais, e novas proteínas fluorescentes foram isoladas de outras espécies de corais e anêmonas, tais como: *Anemonia sulcata* (Windemann *et al.* 2000), *Heteractis crispa* (Gurskaya *et al.* 2001), *Galaxidae* sp. (Karawasa *et al.* 2003), *Acropora* sp., *Fungia concinna* (Karawasa *et al.* 2004), *Actinia equina* (Shkrop *et al.* 2005), *Clavularia* sp. (Ai *et al.* 2006), *Montipora* sp. (Kogure *et al.* 2006), *Entacmaea quadricolor* (Subach *et al.* 2008). Porém, apesar da diversidade natural dessas proteínas, muitas tentativas têm sido realizadas para produzir versões novas e melhoradas que são mais brilhantes, abrangem uma ampla faixa espectral, e também exibem fotoestabilidade, reduzida oligomerização, insensibilidade a pH e taxas de maturação mais rápidas (Shaner *et al.* 2007).

A grande importância das proteínas fluorescentes na pesquisa biológica foi reconhecida com o Prêmio Nobel de Química a Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsien Y em 2008 (Shimomura 2009, Jones *et al.* 2012). Outro fator que evidencia interesse científico e comercial sobre as PF é o crescente aumento no número de publicações na área. Somente em 2013, mais de onze mil artigos foram publicados contendo o termo “Proteínas fluorescentes” (Figura 5A)



**Figura 5-** Gráfico representativo do número de publicações incluindo o termo proteínas fluorescentes e proteínas vermelhas fluorescentes desde 1958 até 2013 (Dados graficados de Corlan 2016).

Dentro da ampla variedade de proteínas fluorescentes, as proteínas vermelhas (RFP, do inglês *red fluorescent protein*) têm uma série de vantagens como a possibilidade de ser excitada em comprimentos de onda específicos, o que permite sua aplicação em pesquisa com imagem multicolorida. Além disso, essas PF apresentam fototoxicidade baixa e a probabilidade de estar associada a autofluorescência em células vivas é reduzida (Miyawaki 2012, Shen *et al.* 2015).

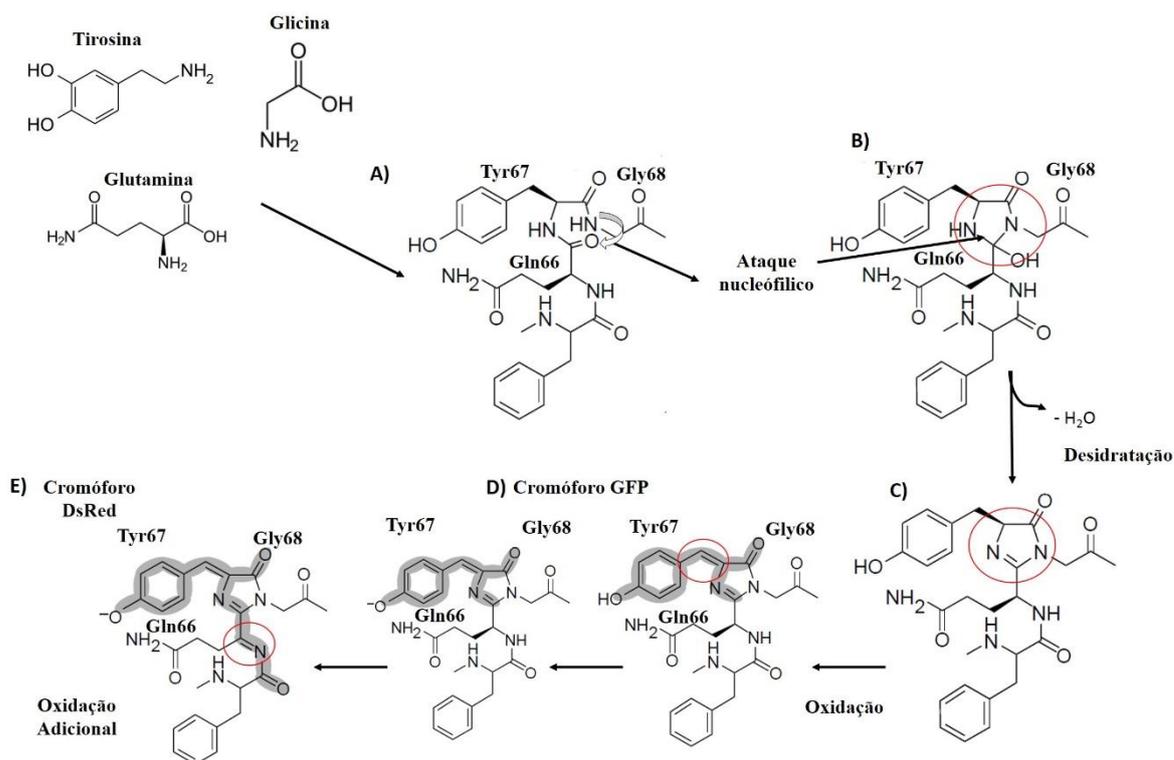
Após a identificação das RFP e seu desenvolvimento como proteínas marcadoras, a escala de cores das proteínas fluorescentes abrangeu a região visível do espectro eletromagnético (para revisão das proteínas fluorescentes e suas características ver Anexo 9.1). As RFP também ganharam popularidade ao longo do tempo e, portanto, o número de publicações usando as proteínas fluorescentes vermelhas teve um aumento considerável a partir de 2002 (Figura 5B).

A primeira proteína vermelha fluorescente derivada do coral *Discosoma striata* foi reportada por Matz e colaboradores (1999) e têm sido extensivamente estudada e modificada a nível molecular (Patterson *et al.* 2001). Essa RFP foi originalmente chamada como drFP583 e atualmente é conhecida como DsRed. A DsRed é composta por 225 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 28-kDa, possui uma fluorescência laranja-vermelho, com um comprimento de onda de excitação máxima de 558 nm e de emissão máximo de 583 nm. Porém, o comprimento de emissão máximo pode ser ainda prolongado para 602 nm devido à alteração do aminoácido Lisina (Lys)

para Metionina (Met) na posição 83 (L83M), o qual representa o comprimento de onda mais longo já relatado para uma proteína fluorescente de tipo selvagem (Baird 2000).

A DsRed tem um coeficiente de extinção (EC, do inglês *extinction coefficient*, definido como a estimativa da concentração molar de uma solução a partir da sua absorvância) é de 75.000 e rendimento quântico (QY, do inglês *quantum yield*, definido como a razão entre o número de fótons emitidos dividido pelo número de fótons absorvidos) de 0,79, maior que outras proteínas vermelhas fluorescentes (p. ex. mRuby2 EC: 11.300, QY: 0,38; mRFP EC: 50.000, QY: 0,25; mCherry EC: 72.000, QY: 0,22; dTomato EC: 69.000, QY: 0,69) além de alto brilho, estabilidade contra variações de pH, e uma incompleta maturação da proteína pode levar à formação de um cromóforo verde fluorescente (Wiehler *et al.* 2001, Verkhushka *et al.* 2003, Hense 2015). No entanto, a DsRed tem alguns inconvenientes. Estudos cristalográficos biofísicos e de raios-X revelaram que DsRed possui uma estrutura tetramérica, com uma taxa de maturação lenta (Baird 2000, Wall *et al.* 2000, Yarbrough *et al.* 2001, Parajo *et al.* 2001, Sacchettia *et al.* 2002, Shen 2015).

Estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de elucidar a estrutura e mecanismo de formação do cromóforo na proteína DsRed. A DsRed forma seu cromóforo a partir de três aminoácidos sequenciais: Glutamina (Gln ou Q) na posição 66, Tirosina (Tyr ou Y) na posição 67, Glicina (Gly ou G) na posição 68. Na formação do cromóforo ocorre um ataque nucleofílico (a Gly68 cede íons  $H^+$  à Gln66 formando um grupo hidroxílico) o que produz a ciclização do esqueleto entre Gln e Gly, dando origem ao anel imidazolinônico. Após a ciclização, ocorre uma perda de  $H_2O$  (desidratação) da ligação entre o carbono alfa ( $C\alpha$ ) e carbono beta ( $C\beta$ ). Posterior à desidratação ocorre uma oxidação no  $C\alpha$  e o grupo N-terminal da Tyr67 (formação do cromóforo nas proteínas verde fluorescentes). No entanto, a DsRed mostra uma reação de maturação adicional, com uma oxidação nos átomos estruturais do resíduo Gln, consistente com a criação de uma ligação dupla entre  $C\alpha$  e o grupo N-terminal da Gln66 (Figura 6) (Gross *et al.* 2000, Wall *et al.* 2000, Miyawaki *et al.* 2003).



**Figura 6-** Mecanismo de formação do cromóforo na proteína DsRed. Os aminoácidos sequenciais: Glutamina 66, Tirosina 67, Glicina 68. **A)** Ligação dos três aminoácidos para formação do cromóforo, nesta ligação ocorre um ataque nucleofílico (indicado pela flecha) entre a Glicina 68 e a Glutamina 66, **B)** Ciclização do esqueleto entre Glutamina e Glicina dá origem ao anel imidazolinônico (círculo vermelho), **C)** Posterior à ciclização ocorre uma perda de H<sub>2</sub>O (desidratação) da ligação entre o carbono alfa (C $\alpha$ ) e carbono beta (C $\beta$ ), **D)** Uma oxidação no C $\alpha$  e o grupo N-terminal da Tirosina 67 produz a formação do cromóforo nas proteínas verde fluorescentes como GFP, **E)** Uma oxidação nos átomos estruturais do resíduo Gln, consistente com a criação de uma ligação dupla entre C $\alpha$  e o grupo N-terminal da Gln66 gera a formação do cromóforo na proteína DsRed.

A proteína DsRed já foi modificada através de metodologias de mutagênese randômica ou dirigida, a fim de produzir uma variedade de proteínas mutantes com características diferenciadas (Fradkov *et al.* 2000, Gurskaya *et al.* 2001, Wiehler *et al.* 2001, Knop *et al.* 2002, Terskikh *et al.* 2002, Bevis & Glick 2002, Klasen & Wabl 2004, Shaner *et al.* 2004, Eli & Chakrabarty 2006). Em 2002, Bevis & Glick relataram uma variante da proteína DsRed, chamada de DsRed2, a qual tem uma taxa de maturação mais rápida. A DsRed2 contém seis substituições de aminoácidos (R2A, K5E, K9T, V105A, I161T, S197A) que resultam numa rápida formação do cromóforo e reduzem a tendência da proteína em formar agregados insolúveis, frequentemente observados em sistemas de células bacterianas e de mamíferos, embora forme provavelmente a mesma estrutura

tetramérica da DsRed (Yarbrough *et al.* 2001, Bevis & Glick 2002). Porém, devido ao aumento na taxa de maturação, a DsRed2 é uma proteína mais compatível com proteínas verdes fluorescentes em múltiplas experiências de marcação (Shen *et al.* 2015), tornando-a um alvo alternativo na produção de novas variantes de proteínas, através de metodologias de mutagêse randômica ou dirigida.

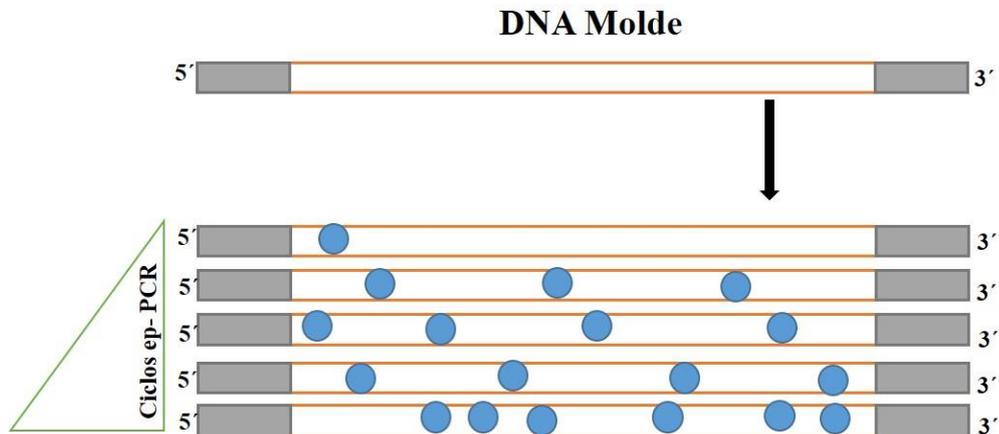
Embora haja uma grande quantidade de estudos envolvendo as proteínas fluorescentes, ainda é necessário continuar investindo esforços na busca de novas proteínas com características diferenciadas, como por exemplo a cor, permitindo a sua aplicação direta na piscicultura ornamental. Desta forma, produzir a partir de mutagênese, novas variantes de proteínas fluorescentes é um passo importante na produção de peixes transgênicos ornamentais fluorescentes.

### 1.3 *Error-prone* PCR (epPCR) para mutagênese randômica

O método mais utilizado para gerar variantes com mutações aleatórias (mutagênese randômica) de um gene é a técnica molecular *error-prone* PCR (epPCR) que consiste de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) propensa a erros, através de modificações dos métodos convencionais de PCR, p. ex. alteração da quantidade de nucleotídeos, concentração de magnésio ( $Mg^{+2}$ ), adição de manganês ( $Mn^{+2}$ ) idealizado para aumentar de modo controlado a taxa de erro natural de uma DNA polimerase. Este método pode ser usado para geração de bibliotecas de sequências de nucleotídeos e para introdução de mutações aleatórias em determinada sequência de interesse. A sequência do gene a ser mutado está delimitado pelos sítios de ligação dos oligonucleotídeos usados na PCR. O número médio de mutações por molde de DNA aumenta em função do número de ciclos na reação de epPCR (Figura 7). Além disso, a concentração do molde de DNA utilizado, a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos, e o tamanho do fragmento a ser amplificado são fatores que influenciam na quantidade de mutações geradas. Quando o DNA de interesse mutado vai codificar uma proteína, a fração de aminoácidos mutados será maior do que a fração de nucleotídeos mutantes por uma razão de aproximadamente 2,2, uma vez que uma mutação em qualquer uma das três posições de um códon pode resultar em uma substituição de aminoácido (Wilson & Keefe 2000, Cirino *et al.* 2003, Pritchard *et al.* 2005).

Em geral, os DNA mutados gerados pela epPCR são clonados em vetores de expressão e o produto desta clonagem usado para transformação bacteriana.

Posteriormente, as colônias resultantes podem ser selecionadas e purificadas. Os melhores clones selecionados são sequenciados e podem ser utilizados em um outro evento de mutagênese ou, a proteína expressa é purificada e avaliada bioquimicamente.



**Figura 7-** Mutagênese randômica por *error-prone* PCR (epPCR). Mutações aleatórias são inseridas na sequência de DNA devido a condições que reduzem a fidelidade da DNA polimerase. A sequência de DNA a ser mutada (representada por quadros laranja) está delimitada pelos oligonucleotídeos (representados por quadros cinza) e o número de mutações (representado por círculos) aumenta de acordo a quantidade de ciclos da reação de PCR.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver novas variantes de proteínas fluorescentes para aplicação na piscicultura ornamental.

### 2.2. Objetivos específicos

- (i) Produzir, por mutagênese randômica, novas variantes da proteína vermelha fluorescente DsRed2;
- (ii) Expressar as novas variantes proteicas em *Escherichia coli*;
- (iii) Purificar e realizar análises espectrais nas proteínas mutadas com maior potencial de aplicação na piscicultura ornamental;
- (iv) Produzir *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos expressando as novas proteínas fluorescentes selecionadas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, no Biotério de peixes transgênicos, ambos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas (LaMMP) do Instituto de Química da Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ).

#### 3.1 Biossegurança e Comissão de Ética no Uso de Animais

O Laboratório de Biologia Molecular do ICB/FURG possui o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) No. 0112/99, emitido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para o desenvolvimento de pesquisa com organismos geneticamente modificados (OGM). O uso de peixes na metodologia desenvolvida no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Rio Grande – FURG (Protocolo Pq024/2015) (Anexo 9.2).

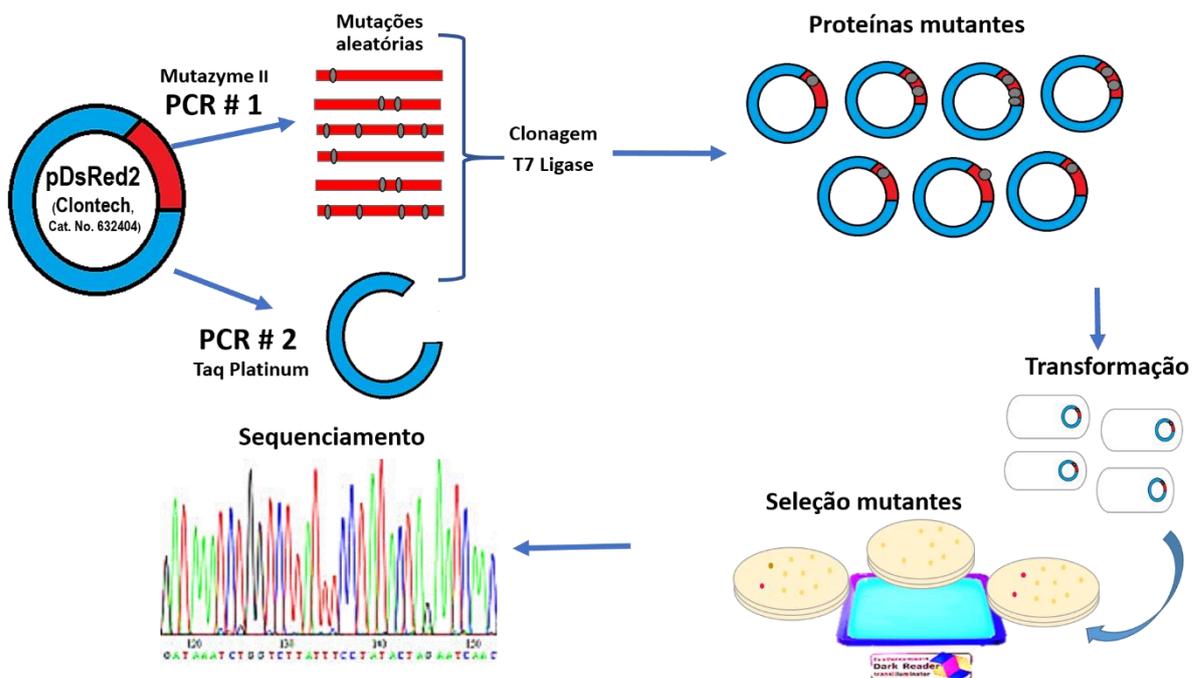
#### 3.2 Obtenção das proteínas variantes: mutagênese randômica

A mutagênese randômica do gene *DsRed2* foi realizada usando o kit *GeneMorph® II Random Mutagenesis* de acordo com o protocolo do fabricante. O vetor pDsRed2 (Clontech, Cat. No. 632404) foi utilizado como molde para amplificação do gene que codifica a proteína DsRed2. A *error-prone* PCR do gene *DsRed2* foi desenvolvida com o uso dos oligonucleotídeos DsRed2-FOR e DsRed2-REV (Tabela 2). A amplificação do gene ocorreu nas seguintes condições: 94°C/2 min, 30 ciclos de 94°C/15 s, 68°C/30 s, 72°C/1 min e 1 ciclo final de 72°C/5 min. Uma segunda PCR usando o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Brasil) foi realizada no vetor pDsRed2 com o uso dos oligonucleotídeos DsRed2 *EcoRI*-FOR e DsRed2 *BamHI*-REV (Tabela 2), seguindo as condições: 94°C/ 2 min, 30 ciclos de 94°C/15 s, 60°C/ 30 s, 72°C/ 2 min e 1 ciclo final de 72°C/5 minutos. Em seguida, os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados usando o kit *Illustra GFX® PCR DNA* (GE Healthcare). O vetor pDsRed2 e o gene *DsRed2* purificados foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI*-HF (New England, Biolabs Cat. No. R3136) e *EcoRI*-HF (New England, Biolabs Cat. No. R3101) e incubados por 2 horas à 37°C. As enzimas foram inativadas à 65°C por 20 min. Ambos os fragmentos digeridos foram quantificados no fluorímetro Qubit (Life Technologies, Brasil) utilizando o kit *Quant-iT dsDNA BR*

Assay (Invitrogen, Brasil). Em seguida, o vetor (pDsRed2) e o inserto (gene DsRed2 mutado) foram ligados utilizando a enzima T7 DNA ligase (New England, Biolabs Cat. No M0318) de acordo com o protocolo do fabricante (Figura 8).

**Tabela 2-** Oligonucleotídeos utilizados na reação de mutagênese randômica.

| Oligonucleotídeos         | Sequência (5' - 3')             |
|---------------------------|---------------------------------|
| DsRed2 –FOR               | CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG AT  |
| DsRed2 – REV              | AGT TGG TAA TGG TAG CGA CCG GC  |
| DsRed2 <i>EcoRI</i> – FOR | CGG CCG CGA CTC TAG AAT TCC AAC |
| DsRed2 <i>BamHI</i> - REV | ACC GGT ACC CGG GGA TCC TCT A   |



**Figura 8-** Esquema representativo para a produção do vetor contendo o gene *DsRed2* mutado. O gene *DsRed2* foi usado numa reação de mutagênese randômica. Os genes mutados foram novamente ligados no vetor pDsRed2. Posteriormente, foram transformados em *Escherichia coli*. Os clones que apresentaram fluorescência diferente do controle foram selecionados, purificados e sequenciados.

### 3.3 Transformação bacteriana

O produto da ligação foi transformado em *Escherichia coli* TOP 10 eletrocompetentes através de eletroporação (cubeta 0,2 cm, 2,5 kV/cm, 25 µF, 200 Ω, 1 pulso) com o auxílio do sistema de eletroporação *Gene Pulser Xcell™* (BioRad) seguindo o protocolo do fabricante. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas contendo meio Luria Bertani (LB) com ágar e o antibiótico ampicilina (50 µg/mL) incubadas à 37° por 16 horas.

### 3.4 Colônias bacterianas transformadas

As bactérias transformadas com o plasmídeo pDsRed2 (contendo o gene não mutado) e pDsRed2 (contendo o gene mutado) foram observadas no transluminador *Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator* (Invitrogen). Este transluminador possui uma fonte de luz LED (do inglês *Light emitting diodes*) que excita em um comprimento de onda de 470 nm. As placas foram observadas através de um filtro âmbar e as colônias com características de fluorescência diferente da fluorescência do pDsRed2, foram selecionadas e inoculadas em meio Luria Bertani (LB) líquido contendo o antibiótico ampicilina (50 µg/mL), incubadas por 16 horas à 37°C, com agitação constante de 243 g em agitador orbital *Stuart Shaking incubator SI500* (Stuart, Brasil). Posteriormente, os plasmídeos contendo as proteínas foram recuperados com a utilização do kit de purificação *Illustra™- Plasmid Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.

### 3.5 Sequenciamento

Os plasmídeos recuperados foram sequenciados no Laboratório de Genética Molecular do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Para isso, foram usados os oligonucleotídeos pDsRed (SM)-FOR e pDsRed (SM)-REV (Tabela 3).

**Tabela 3-** Oligonucleotídeos utilizados para reações de sequenciamento

| Oligonucleotídeos       | Sequência (5´- 3´)                         |
|-------------------------|--|
| pDRed2(SM) – FOR        | GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC            |
| pDsRed2(SM) – REV       | GGG CCC GTA CGG CCG ACT A                  |
| PCDFBGL17 (MluI) – FOR  | CTG ACG CGT TAC CGG AAG CAG TGT GAC CGT GT |
| PCDFBGL17 (ECORI) – REV | CAC GAA TTC TCG ACG CTC TCC CTT ATG CGA CT |

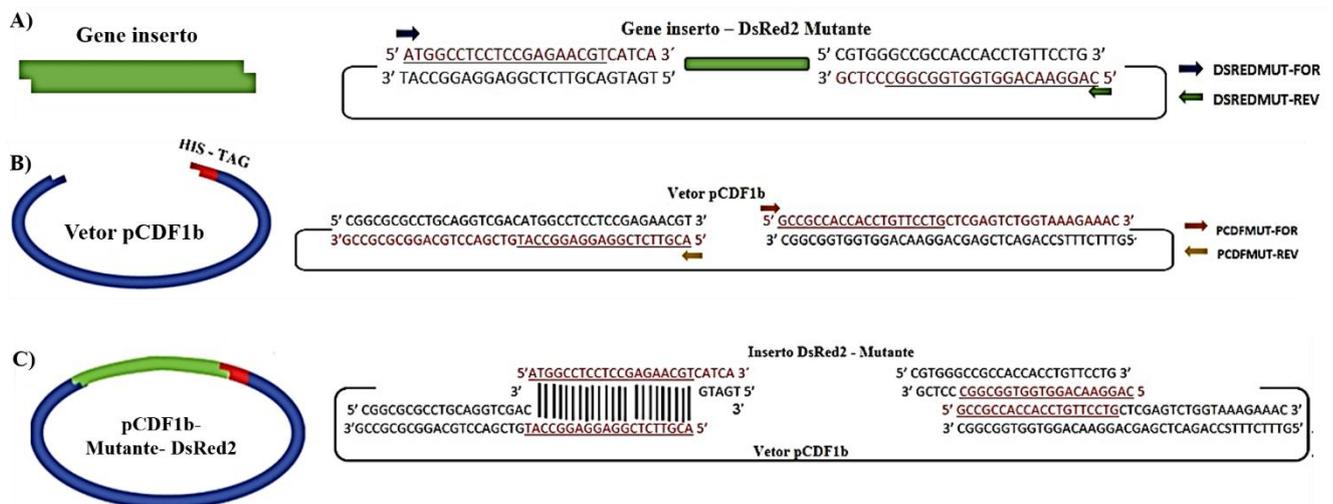
### 3.6 Construções genéticas para purificação das proteínas

O gene *DsRed2* (controle) e os genes selecionados com mutações confirmadas por sequenciamento, foram usados para a produção de construções genéticas, as quais são específicas para a purificação de proteínas. Para isso, foi usada a metodologia de clonagem circular por extensão da polimerase (CPEC, do inglês *circular polymerase extension cloning*) (Quan & Tian 2011). A proteína mutada e o controle foram amplificados por PCR usando os oligonucleotídeos pDsRed(MUT)-FOR e pDsRed(MUT)-REV (Tabela 4), seguindo as condições: 94°C/ 2 min, 25 ciclos de 94°C/ 15 s, 60°C/ 30 s, 72°C/ 1 min e 1 ciclo final de 72°C/ 5 min. O fragmento amplificado (677 pb) foi clonado no vetor de expressão pCDF1b (Novagen, Cat. No. 71330-3). Este

vetor codifica uma sequência N-terminal His-Tag e uma sequência C-terminal S-Tag, usadas para purificação da proteína. Foi realizada uma segunda PCR para amplificar o vetor pCDF1b com o uso dos oligonucleotídeos PCDF(MUT)-FOR e PCDF(MUT)-REV (Tabela 4). Esses oligonucleotídeos possuem uma sequência de sobreposição com o fragmento do gene mutado possibilitando que a CPEC ocorra. Uma terceira PCR foi desenvolvida usando a enzima *TAKARA LA Taq* (Clontech Cat. No. RR002A), seguindo as condições: 94°C/ 2min, 30 ciclos de 94°C/15 s, 63°C/30 s, 68°C/4 min e 1 ciclo final 72°C/ 5min. O DNA molde para a reação CPEC foram os fragmentos de fita dupla do inserto (gene mutado) e do vetor (pCDF1b) adicionados na proporção 1:1 (Figura 9). Onde, no primeiro ciclo de PCR os fragmentos são desnaturados, nos ciclos seguintes as fitas simples vão se anelar na sequência de sobreposição entre elas, sendo a partir dessa sobreposição que os fragmentos vão se estender para formar a dupla fita do plasmídeo circular pCDF1b-Mutante e pCDF-DsRed2, respectivamente. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

**Tabela 4-** Oligonucleotídeos usados para construções genéticas para purificação das proteínas.

| Oligonucleotídeos | Sequência (5´- 3´)                                    |
|-------------------|---|
| pDsRed(MUT) –FOR  | ATG GCC TCC TCC GAG AAC GTC ATC A                     |
| pDsRed(MUT) – REV | CAG GAA CAG GTG GTG GCG GCC CTC G                     |
| PCDF(MUT) – FOR   | GCC GCC ACC ACC TGT TCC TGC TCG AGT CTG GTA AAG AAA C |
| PCDF(MUT) – REV   | ACG TTC TCG GAG GAG GCC ATG TCG ACC TGC AGG CGC GCC G |



**Figura 9-** Representação esquemática da clonagem circular por extensão da polimerase (CPEC). **A)** Amplificação do gene *DsRed2* mutado (flechas azul e verde indicam a posição dos oligonucleotídeos), **B)** Fragmento do vetor pCDF1b, (flecha laranja e amarela indicam os oligonucleotídeos), **C)** Ligação pela CPEC, A e B são usados como molde de DNA (proporção 1:1).

### 3.7 Transformação bacteriana

Os vetores de expressão produzidos (pCDF-Mutante e PCDF-DsRed2) foram transformados em *E. coli* BL21-DE3 eletrocompetentes através de eletroporação (cubeta 0,2 cm, 2,5 kV/cm, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 1 pulso) com o auxílio do sistema de eletroporação *Gene Pulser Xcell*<sup>TM</sup> (BioRad). As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas contendo meio Luria Bertani (LB) com ágar e o antibiótico espectinomicina (100  $\mu$ g/mL) foram incubadas por 16 h à 37°C. Posterior à transformação, as colônias bacterianas foram inoculadas em meio Luria Bertani (LB) líquido, usando o antibiótico espectinomicina (100  $\mu$ g/mL) como agente seletivo, incubados por 16 h, à 37°C com agitação constante de 243 g em agitador orbital *Stuart Shaking incubator SI500* (Stuart, Brasil). Posteriormente, os plasmídeos foram purificados com a utilização do kit *Illustra*<sup>TM</sup>- *Plasmid Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Após a purificação, os plasmídeos foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos pCDFBGL17(MluI)-FOR e pCDFBGL17(EcoRI)-REV (Tabela 3), a fim de confirmar a ligação através da metodologia CPEC.

### 3.8 Expressão e purificação da proteína

Para purificação das proteínas variante e controle (DsRed2), uma colônia de *E. coli* BL21-DE3 contendo o plasmídeo pCDF-Mutante e pCDF-DsRed2 (Item 3.6), foram inoculadas em meio Luria Bertani (LB) líquido contendo antibiótico espectinomicina (100  $\mu$ g/mL) e incubados por 16 h, à 37°C com agitação constante a 243 g em agitador orbital *Stuart Shaking incubator SI500* (Stuart, Brasil). O inóculo foi transferido para 200 mL de meio LB contendo o antibiótico espectinomicina (100  $\mu$ g/mL), mantendo as condições de incubação à 37°C com agitação constante a 243 g. A cultura foi crescida até uma densidade ótica (600 nm) de 0,5 e a expressão foi induzida com isopropyl-*b*-D-thiogalactoside (IPTG) numa concentração final de 0,5 mM durante 30 min com agitação constante de 243 g à 37°C. Posterior à indução, o inóculo foi mantido por 48 h numa temperatura de incubação de 24°C. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 10.700 g à 4°C. O pellet foi ressuscitado em buffer de lise B-PER (THERMO FISHER SCIENTIFIC Cat. No. 78260) (2 mL B-PER/grama de pellet celular). A ressuspensão foi incubada por 15 minutos à 25°C e depois sonicada em 5 séries de um pulso 30 s ON - 20 s OFF (Sonicator ULTRASONIC PROCESSOR Part No. Q125, QSonica). A cultura lisada foi centrifugada a 3.890 g durante 30 min à 25°C para se obter o sobrenadante contendo o extrato de proteína bruto.

### 3.8.1 Purificação da proteína

A proteína foi purificada usando as colunas *HiTrap™ Chelating HP* (GE Healthcare). Resumidamente, a coluna foi preparada com uma lavagem de 5 mL de água destilada, a fim de retirar a solução de etanol 20% em que a coluna é inicialmente armazenada. Após a lavagem, 2 mL de 0,1 M de sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) foram carregados na coluna, seguido de uma lavagem adicional de 5 mL de água destilada. Posteriormente, foi equilibrada com 5 mL de tampão de ligação (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 7,4) a fim de eluir os íons de níquel fracamente ligados. O extrato proteico bruto foi carregado na coluna *HiTrap™*-níquel, imobilizada e incubados por 60 min à 4°C. Posteriormente, a coluna foi lavada com 6 mL de tampão de ligação, seguido por 4 mL de tampão de eluição (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 50 mM imidazol pH 7,4). Uma lavagem final da coluna foi realizada usando 5 mL de tampão eluição 2 (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 2M imidazol pH 7,4). As frações eluídas foram recolhidas e a pureza da proteína foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### 3.8.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada na concentração de acrilamida de 12,5% para o gel de separação e 5% para o gel de concentração. As amostras foram preparadas em tampão de amostra (Tris HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, azul de bromofenol 1%, SDS 10%,  $\beta$ -mercapto-etanol) e aplicadas no gel de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada a 150 V durante 90 min à 25°C. Solução Azul Brilhante de Coomassie R-250 foi utilizada para revelar os géis durante 16 h.

### 3.9 Análise espectral das mutantes

Usando o espectrofluorímetro (Varian, Cary Eclipse) foi realizada uma varredura de fluorescência para conhecer o máximo de emissão e excitação da proteína mutante purificada. A varredura para ambos os espectros de emissão e excitação foi iniciada em 280 nm até 650 nm, com medições a cada 5 nm.

### 3.10 Medição da cinética de maturação

Os plasmídeos pCDF-Mutante e pCDF-DsRed2 (item 3.6) foram transformados em *E. coli* BL21-DE3, posteriormente inoculados em 150 mL de meio líquido LB contendo o antibiótico espectinomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e crescido até uma densidade ótica de 0,5 (600 nm). Em seguida, a expressão das proteínas foi induzida com IPTG 0,5 mM.

Alíquotas da cultura foram coletadas nos tempos de 0,5 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 30 h, 36 h, 45 h, 48 h, 72 h, 96 h e armazenadas com 15% de glicerol à -80°C. A fluorescência em cada ponto coletado foi determinada em 200 µL de cultura utilizando o fluorímetro (VICTOR™ EnLite™ - PerkinElmer), nos comprimentos de onda de emissão de xxx nm e xxx nm, e excitação de xxx nm e xxx nm. Foram realizadas leituras em triplicata, e foram analisadas três repetições de cada amostra, posteriormente foi calculada média das leituras de cada amostra e os dados foram graficados.

### 3.11 Peixes transgênicos fluorescentes

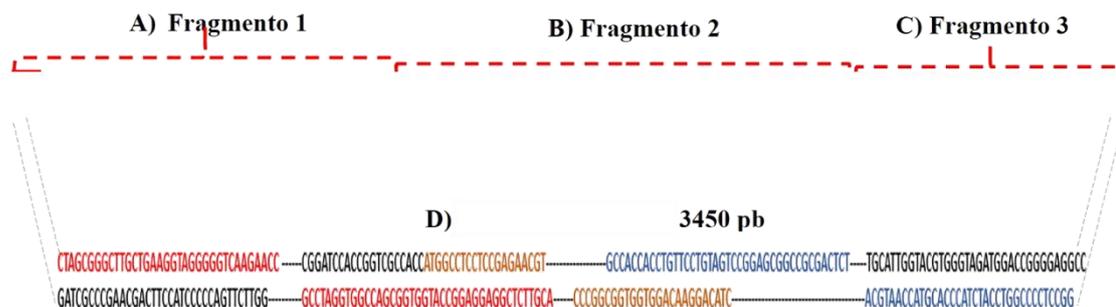
#### 3.11.1 Construção genética

Para a produção do *zebrafish* transgênico fluorescente foi utilizada a construção genética linear xxxx, a qual contém o promotor do gene que codifica para xxxxx, direcionando a expressão do gene da proteína fluorescente mutante xxxxxx. A construção genética linear foi obtida a partir da metodologia CPEC, utilizando a sobreposição de três fragmentos. Os oligonucleotídeos usados para desenvolver a construção xxxxx estão listados na tabela 5.

O fragmento 1 contém o xxxx e o xxxx do xxxx amplificado com os oligonucleotídeos TOL2-FOR e PF(MYO)-REV. O fragmento 2 corresponde ao gene xxxxx amplificado com os oligonucleotídeos pDsRed2-FOR e PF(MUT)-REV. O fragmento 3 contém xxxxx e o xxxxx amplificado com os oligonucleotídeos PF(Tol2)-FOR e TOL2-REV. O DNA molde usado para obter os fragmentos 1 e 3 foi o plasmídeo xxx (desenvolvido por Figueiredo *et al.* 2012). O fragmento 2 foi amplificado usando como molde o plasmídeo pDsRed2 mutante (desenvolvido no presente trabalho item 3.2). A montagem final do fragmento linear foi realizada por PCR, utilizando como molde de DNA os três fragmentos anteriores (Figura 10) na proporção 1:1:1, usando os oligonucleotídeos TOL2-FOR e TOL2-REV (Tabela 5) seguindo as condições da PCR: 94°C/ 2 min, 30 ciclos de 94°C/ 20 s, 63°C/ 30 s, 68°C/ 3:30 min e um ciclo final de 72°C/ 5 minutos.

**Tabela 5-** Oligonucleotídeos usados para construção do fragmento linear pMyoMutanteTol2.

| Oligonucleotídeos | Sequência (5´- 3´)                                   |
|-------------------|--|
| pDsRed2 –FOR      | CCT GCA GGT CGA CTC TAG XXXX                         |
| PF (MUT) – REV    | CTA CAG GAA CAG GTG GTG GCG XXXX                     |
| TOL2 – FOR        | CTA GCG GGC TTG CTG AAG GTA GGG GGT CAA XXXX         |
| PF (MYO) – REV    | ACG TTC TCG GAG GAG GCC ATG GTG GCG ACC GGT GGA XXXX |
| PF (TOL2) – FOR   | GCC ACC ACC TGT TCC TGT AGT CCG GAC CGG CCG XXXX     |
| TOL2 – REV        | GGC CTC CCC GGT CCA TCT ACC CAC GTA CCA XXXX         |



**Figura 10-** Fragmento linear xxxx. **A)** Fragmento 1: xxxxx, **B)** Fragmento 2: xxxx, **C)** Fragmento 3: xxxxxx, **D)** Sobreposição dos fragmentos A, B e C para formar o fragmento linear pxxxxxx.

### 3.11.2 Manutenção dos peixes

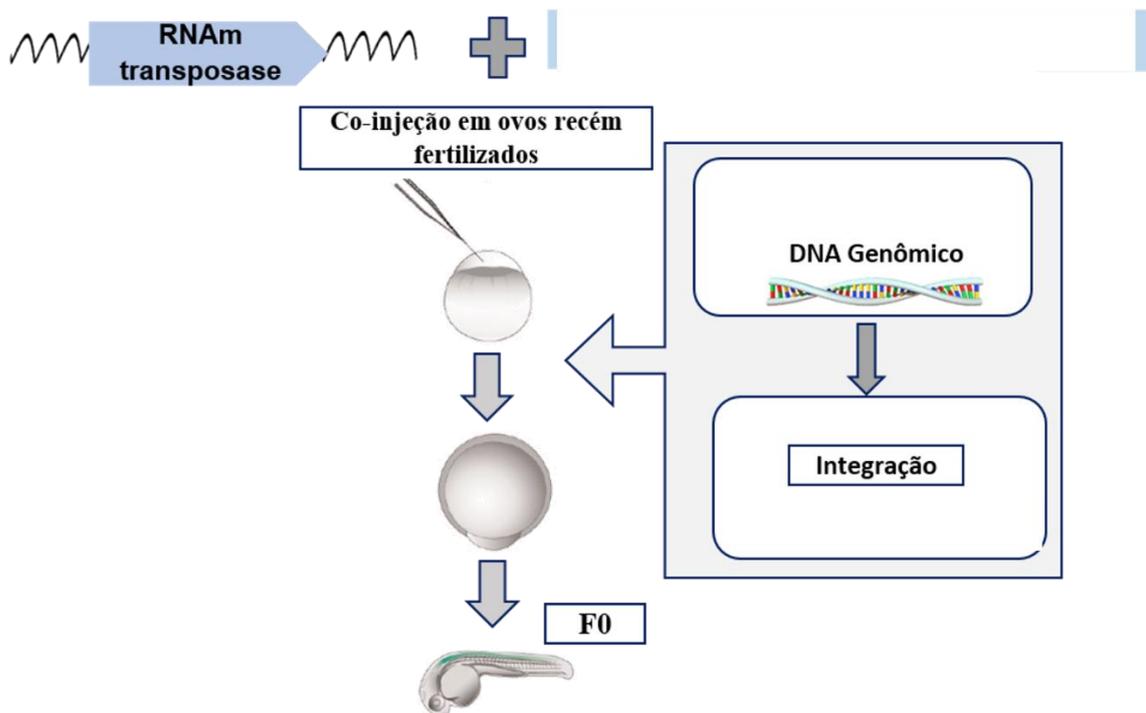
Os reprodutores foram mantidos no Biotério Aquático do ICB/FURG que conta com um ambiente climatizado e um sistema de aquários com circulação fechada, composto de filtro biológico e desinfecção usando luz ultravioleta. O sistema consiste de 50 caixas plásticas com capacidade para 15 L de água, aeradas constantemente. O fotoperíodo (12 h claro – 12 h escuro) é controlado e a temperatura mantida em 28°C. A ração (42,7% de proteína) é fornecida *ad libitum* duas vezes ao dia (10 h e 16 h). Diariamente é realizada a limpeza dos aquários bem como a renovação de parte da água e a medição do pH (~7,0). A concentração de nitrito e amônia foram conferidos semanalmente através de kit comercial.

### 3.11.3 Obtenção dos ovos para microinjeção

Experimentalmente foram utilizados 20 peixes machos e 40 peixes fêmeas. A proporção de macho e fêmea (1:2) é importante para o estímulo reprodutivo. Normalmente, o sucesso se obtém a partir do cruzamento utilizando 2 machos e 4 fêmeas, em aquários individualizados. Desta forma, foram possíveis dez cruzamentos diferentes e simultâneos. A partir desses cruzamentos foram obtidos ovos recém fertilizados para a microinjeção. As desovas foram coletadas no turno da manhã pela colocação de armadilhas especialmente desenhadas depositadas no fundo do aquário, as quais estão compostas por uma pequena caixa plástica coberta com uma rede que permite a passagem dos ovos mas não dos peixes. Portanto, os ovos são protegidos nesta armadilha impedindo a predação das desovas. Após, os ovos foram levados para o processo de microinjeção.

### 3.11.4 Produção de peixes transgênicos

Para a produção de *zebrafish* transgênicos, ovos recém fertilizados foram microinjetados utilizando um picoinjetor motorizado IM-30 (Narishige, Japão). As microagulhas de injeção foram preparadas usando o *PC-10 micro eletrodo* (Narishige GDC-1) a partir de capilares de vidro (Borosilicate Glass Capillaries, WPIIN). Essas microagulhas foram preenchidas com 60 ng/μL de uma solução de DNA contendo o fragmento linear xxxxxx (Item 3.11.1) e o mRNA que codifica para a enzima transposase, na proporção 1:1. A pressão de microinjeção usada foi de 2 atm. Uma pequena quantidade de solução foi depositada nas células com ajuda da microagulha de vidro (Figura 11). Para conseguir aumentar a eficiência de integração do transgene no genoma do *zebrafish* foi utilizada a tecnologia TOL2 (Kawakami 2007).



**Figura 11-** Síntese das principais etapas para a produção de peixes transgênicos. Uma solução de DNA composta do mRNA que codifica para a enzima transposase e o fragmento linear pxxxxx, na proporção 1:1, foram microinjetados em ovos recém fertilizados (no estágio de uma célula). Este DNA foi integrado no genoma dos peixes através da metodologia TOL2. Posterior à microinjeção, os ovos foram mantidos até seu desenvolvimento. Estes peixes constituem a geração filial F0 (peixe mosaico).  
Modificado de Kawakami (2007).

### 3.11.5 Manutenção dos ovos

Controles não microinjetados e ovos microinjetados foram mantidos à 28°C até à eclosão. Diariamente foi realizada a limpeza das desovas com o auxílio de uma micropipeta que permitiu retirar os ovos não viáveis.

### 3.11.6 Verificação da transgenia e seleção de positivos (geração F0)

Dez dias após à eclosão, as larvas foram visualizadas no microscópio de epifluorescência invertido (Olympus IX-2 UCB acoplado à lâmpada ultravioleta Olympus U-RFL-T) a fim de confirmar a transgenia nos peixes. As larvas foram anestesiadas em tricafina MS-222 (100 µg/mL). Após a anestesia, as larvas foram depositadas com o auxílio de uma micropipeta em lâminas e foram observadas no microscópio. Os peixes foram classificados de acordo com seus padrões de expressão seguindo o protocolo estabelecido por Figueiredo *et al.* (2007).

As larvas que apresentaram a fluorescência esperada foram transferidas para aquários berçários. As condições de cultivo nos berçários foram ideais para o desenvolvimento da espécie: temperatura controlada de 28°C, renovação diária da água, aeração constante e o pH e concentração de nitrito aferidos diariamente. Cabe ressaltar que os berçários possuem capacidade de 60 L de água e contam com um filtro biológico. Após a transferência das larvas para os berçários as mesmas foram alimentadas duas vezes ao dia (10 h e 16 h), com ração (42,7% de proteína) moída apropriadamente para este estágio do desenvolvimento. Os indivíduos negativos (aqueles que não apresentarem fluorescência) foram finalizados com uma dose letal de tricafina MS-222 e levados ao descarte de animais do Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

## 4. RESULTADOS

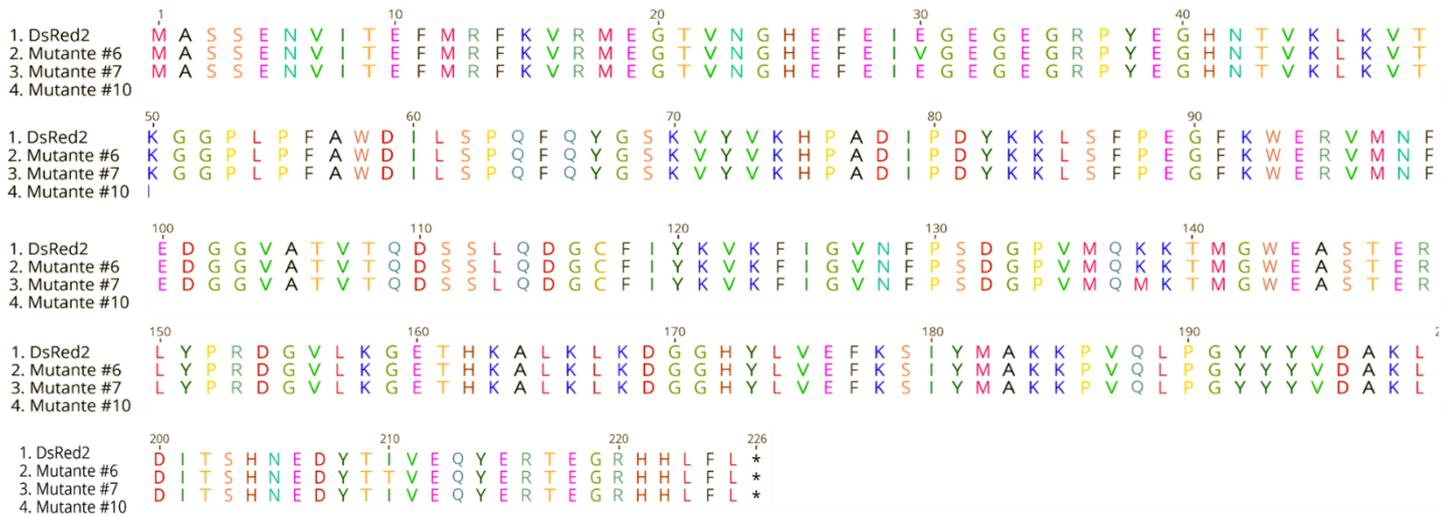
### 4.1 Proteínas mutantes

As condições da epPCR usada no presente trabalho mostrou ser eficiente para gerar mutações aleatórias no gene *DsRed2*. Um total de 12 genes foram isolados e sequenciados. Dos 12 genes sequenciados, três não apresentaram mutação e três apresentaram mutações que levaram à perda de fluorescência, assim, um total de seis genes apresentaram mutações aleatórias. Dentre os seis genes que apresentaram mutações, três (mutante #6, #7, #10) foram selecionados para análise. O critério de seleção foi baseado na fluorescência diferenciada apresentada pelas colônias expressando os genes mutados, onde as mutantes #6 e #7 apresentaram uma fluorescência vermelha mais intensa à fluorescência da proteína DsRed2 (controle) e a mutante #10 apresentou mudança de cor (próxima do xxxxx). As alterações nos genes mutados, geraram mudanças de aminoácidos nas proteínas que estes genes codificam, e o maior número de mutações foi encontrada na mutante #12 (dez alterações de aminoácidos) (Tabela 6). No entanto, essa variante não apresentou fluorescência diferente à fluorescência vermelha para ser analisada posteriormente.

**Tabela 6-** Alterações de aminoácidos encontradas nas variantes fluorescentes.

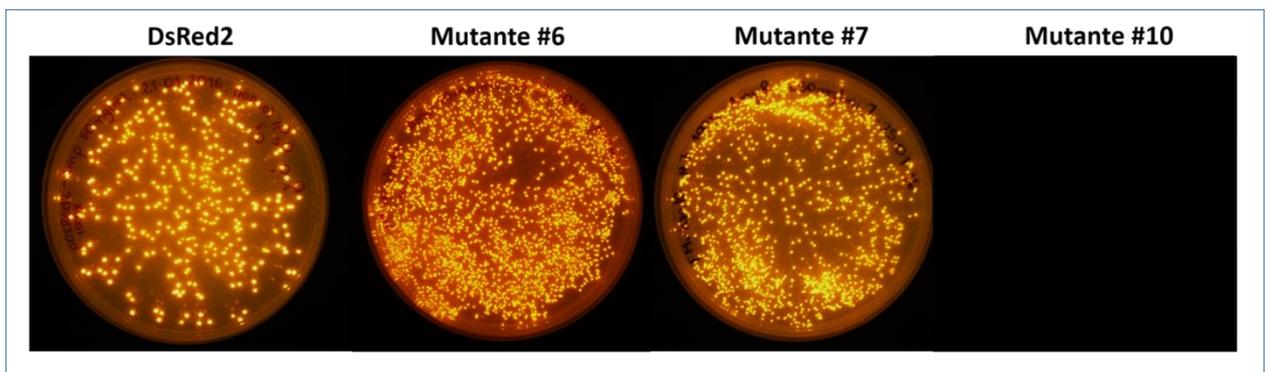
| Identificação               | Aminoácido na DsRed2   | Posição | Aminoácido na variante |
|-----------------------------|------------------------|---------|------------------------|
| <b>Mutante #2 Vermelha</b>  | K - Lisina (Lys)       | 50      | N - Asparagina (Asn)   |
|                             | V - Valina (Val)       | 71      | A - Alanina (Ala)      |
|                             | K - Lisina (Lys)       | 92      | E - Glutâmico (Glu)    |
|                             | E - Glutâmico (Glu)    | 144     | V - Valina (Val)       |
|                             | G - Glicina (Gly)      | 170     | S - Serina (Ser)       |
|                             | T - Treonina (Thr)     | 209     | I - Isoleucina (Ile)   |
| <b>Mutante #6 Vermelha</b>  | E - Glutâmico (Glu)    | 30      | V - Valina (Val)       |
|                             | I - Isoleucina (Ile)   | 210     | T - Treonina (Thr)     |
| <b>Mutante #7 Vermelha</b>  | K - Lisina (Lys)       | 138     | M - Metionina (Met)    |
| <b>Mutante #10 xxxxxx</b>   | xxxxxxxxxxx            | xxx     | xxxxxxx                |
| <b>Mutante #11 Vermelha</b> | P - Prolina (Pro)      | 53      | S - Serina (Ser)       |
| <b>Mutante #12 Vermelha</b> | E - Glutâmico (Glu)    | 30      | V - Valina (Val)       |
|                             | F - Fenilalanina (Phe) | 56      | L - Leucina (Leu)      |
|                             | I - Isoleucina (Ile)   | 79      | V - Valina (Val)       |
|                             | L - Leucina (Leu)      | 85      | N - Asparagina (Asn)   |
|                             | T - Treonina (Thr)     | 108     | I - Isoleucina (Ile)   |
|                             | K - Lisina (Lys)       | 163     | E - Glutâmico (Glu)    |
|                             | H - Histidina (His)    | 172     | P - Prolina (Pro)      |
|                             | V - Valina (Val)       | 187     | G - Glicina (Gly)      |
|                             | Y - Tirosina (Tyr)     | 192     | H - Histidina (His)    |
|                             | E - Glutâmico (Glu)    | 206     | D - Aspartico (Asp)    |

A sequência de aminoácidos das três proteínas selecionadas (mutante #6, #7, #10) e o controle não mutado (DsRed2) foram alinhadas e o resultado mostrou que as posições dos aminoácidos alterados apresentaram uma distribuição aleatória e não mostrou posições repetidas entre elas (Figura 12).



**Figura 12-** Alinhamento de aminoácidos das proteínas DsRed2, mutante #6, mutante #7, e mutante # 10. As posições das mutações estão destacadas no quadrante vermelho.

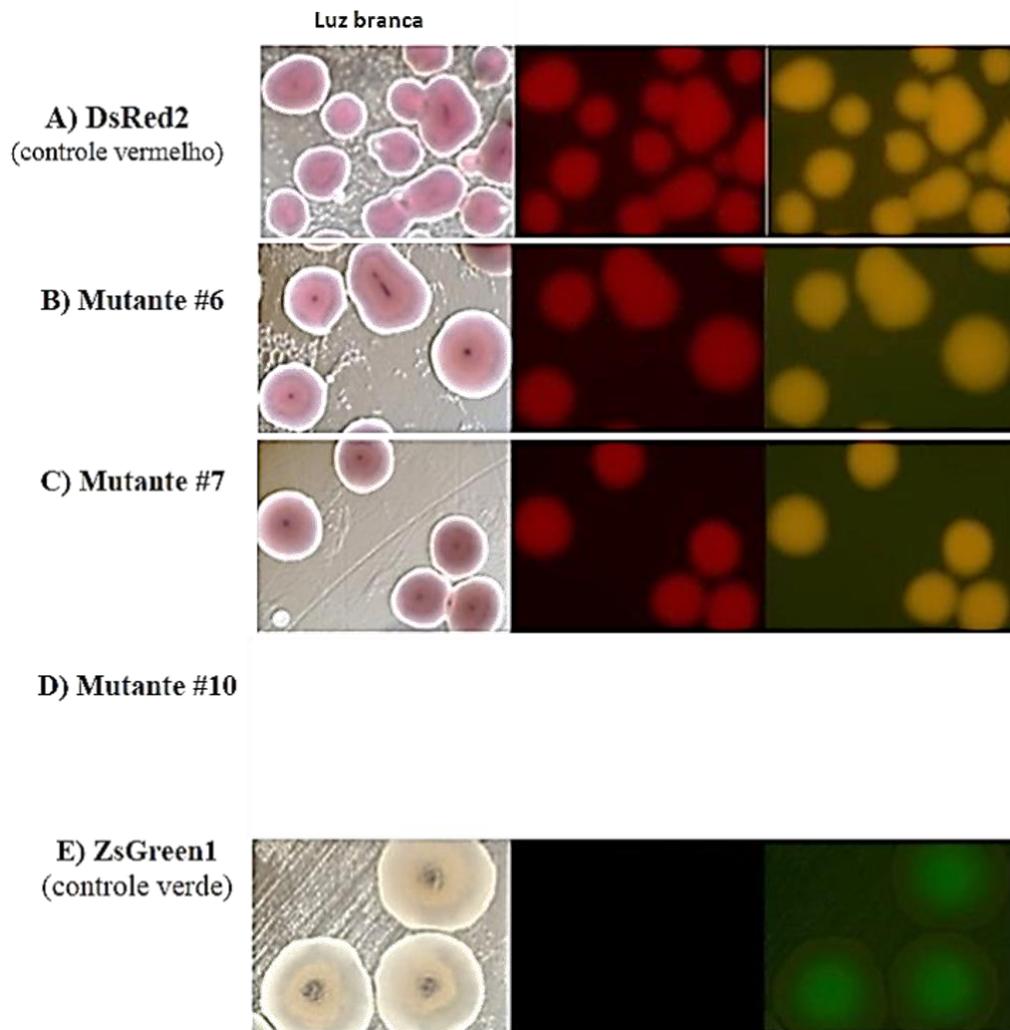
As mutantes #6, #7 e #10 foram transformadas novamente a fim de obter uma placa individualizada de cada variante (Figura 13).



**Figura 13-** Colônias de *E. coli* transformadas com as variantes da proteína vermelha fluorescente

As *E. coli* expressando as mutante #6, #7, #10 e controle DsRed2 selecionadas foram também observadas no microscópio de fluorescência. As colônias de bactérias expressando a mutante #6, mutante #7 e a DsRed2 apresentaram o mesmo padrão com presença de fluorescência somente quando excitada em xxxxx (Figura 14A, B e C), enquanto a mutante #10, apresentou um padrão de fluorescência diferente, (Figura 14D).

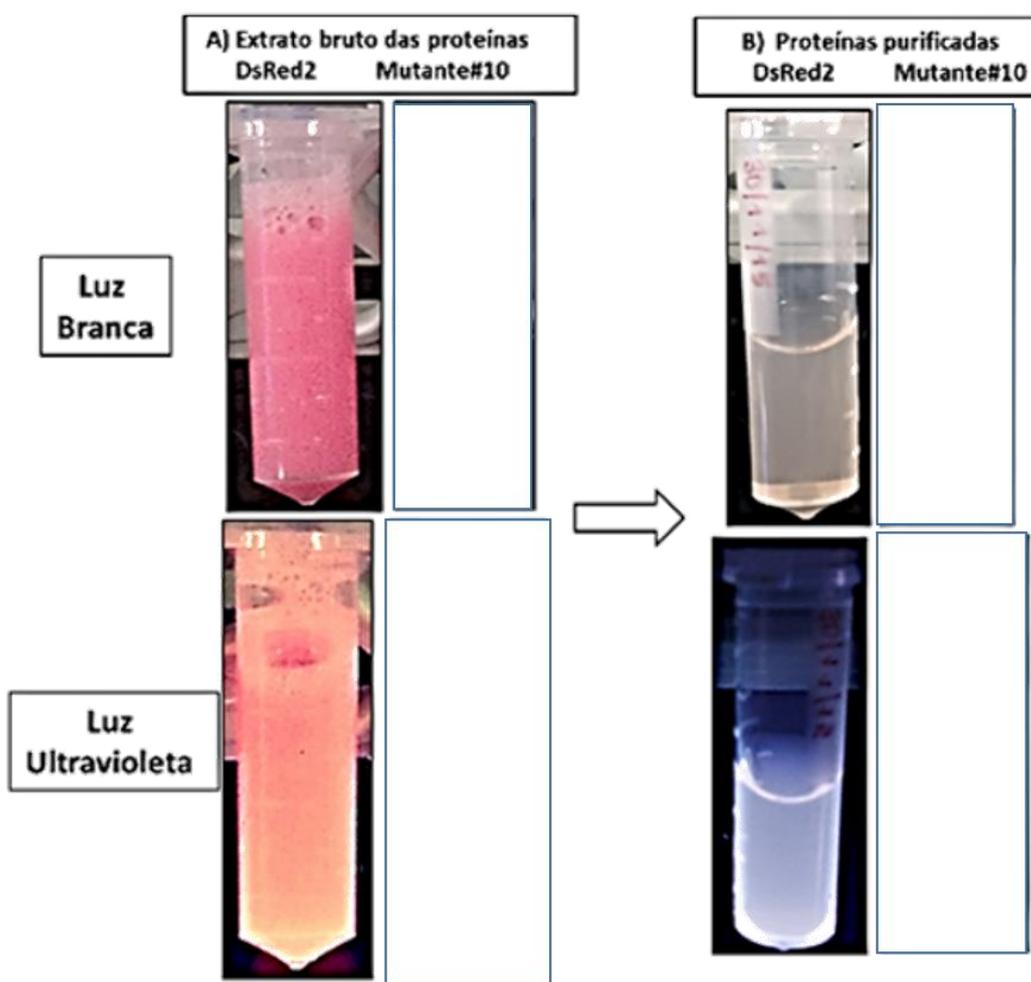
Devido ao fato da mutante #10 ter apresentado padrão de fluorescência diferente, uma colônia expressando a proteína ZsGreen (proteína verde fluorescente) foi usada como controle positivo. Observando que essa proteína apresenta somente fluorescência quando excitada na luz azul. (Figura 14E).



**Figura 14-** Imagens do microscópio de fluorescência das colônias expressando as variantes fluorescentes **A)** DsRed2 (controle), **B)** Mutante #6, **C)** Mutante #7, **D)** Mutante #10, e **E)** ZsGreen1 (controle).

#### 4.2 Purificação da proteína

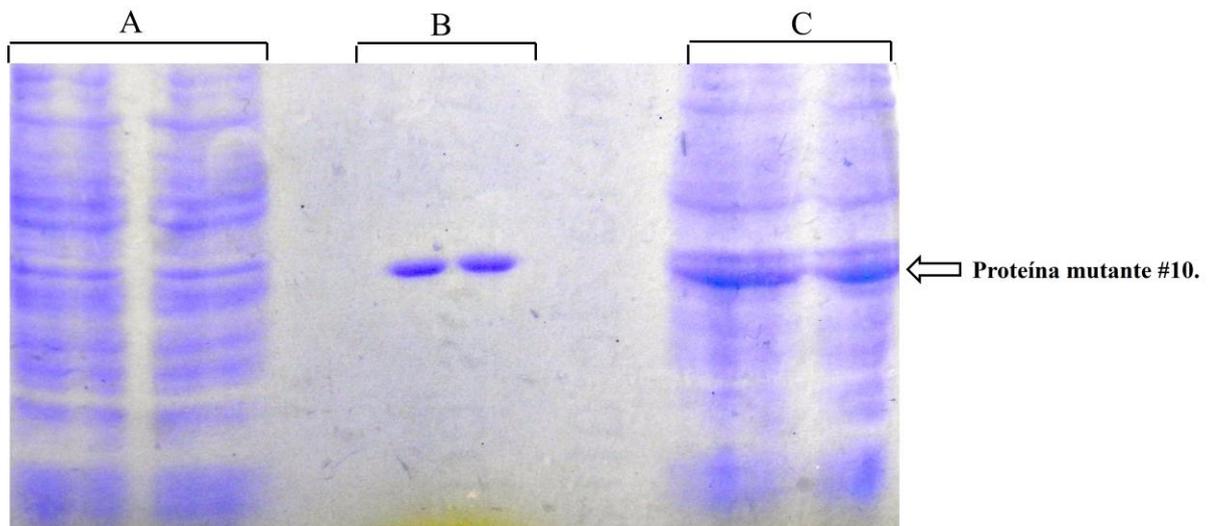
Apesar da mutante #6 e mutante #7 continuaram apresentando fluorescência com alteração de aminoácidos, somente a mutante #10 apresentou mudança de cor, e além disso, apresentou alterações de aminoácidos, por estes dois motivos, foi escolhida para ser purificada. Portanto, somente a mutante #10 foi inserida num vetor de expressão para sua posterior purificação. A purificação foi realizada através da adição de seis histidinas (His-Tag) em uma das extremidades das proteínas DsRed2 (controle) e mutante #10, a qual mostrou não interferir na emissão de fluorescência das proteínas (Figura 15).



**Figura 15-** Proteínas DsRed2 (controle) e mutante #10. **A)** Extrato bruto da proteína. **B)** Proteínas purificadas. Visualizadas na luz branca e luz ultravioleta.

#### 4.2.1 SDS-PAGE

A proteína mutante #10 purificada foi analisada em gel de poliacrilamida. O resultado demonstra que a proteína foi purificada com sucesso, uma vez que foi observada a presença de uma única banda (Figura 16B). Também foi observada no extrato bruto da *E. coli* expressando a mutante #10, a aparição da mesma banda em igual concentração à da proteína purificada (Figura 16C) indicando a presença dessa proteína na bactéria. Por outro lado, o extrato bruto da *E. coli* sem expressão da proteína não apresentou a mesma banda.

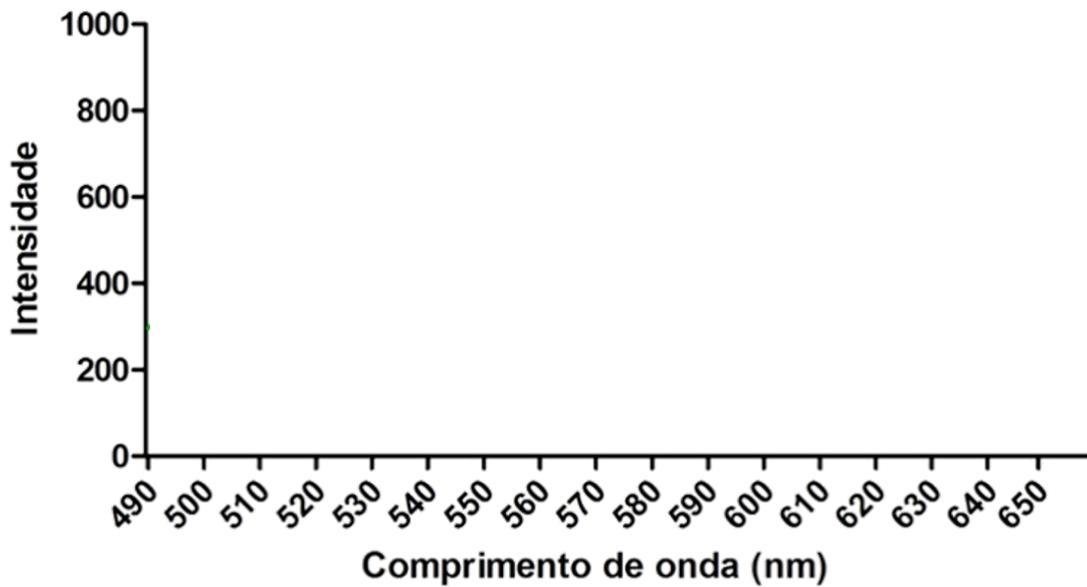


**Figura 16-** Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). **A)** Extrato bruto de *E. coli* sem expressão da proteína mutante #10, **B)** Proteína mutante #10 purificada, **C)** Extrato bruto de *E. coli* expressando a proteína mutante.

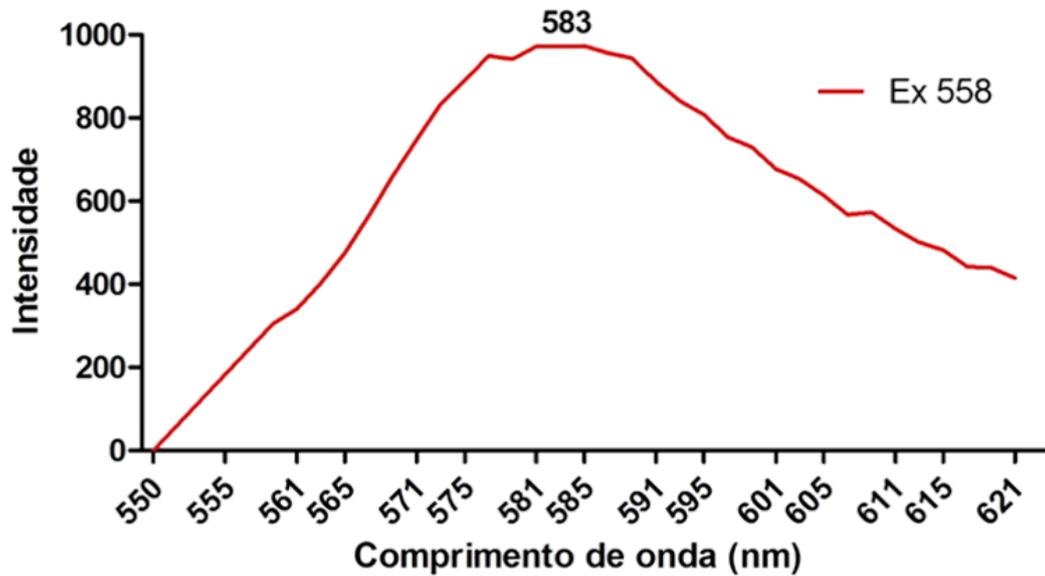
#### 4.3 Análise espectral da proteína mutante

A absorção de luz e fluorescência foram avaliadas nas proteínas purificadas (mutante #10 e DsRed2 controle). A varredura no espectrofluorímetro realizada na mutante #10 revelou que esta variante xxxxxx. Quando excitada a xxxx nm mostra um pico de emissão em xxxx nm, que corresponde à fluorescência xxxxx no espectro eletromagnético. Quando excitada em xxxx nm, apresenta um pico de emissão em xxx nm, que corresponde à fluorescência xxxxx (Figura 17A). Por outro lado, a proteína vermelha DsRed2, usada como controle, apresenta somente um pico máximo de emissão em 583 nm quando excitada em 558 nm (Figura 17B).

### A) MUTANTE #10



### B) DsRed2

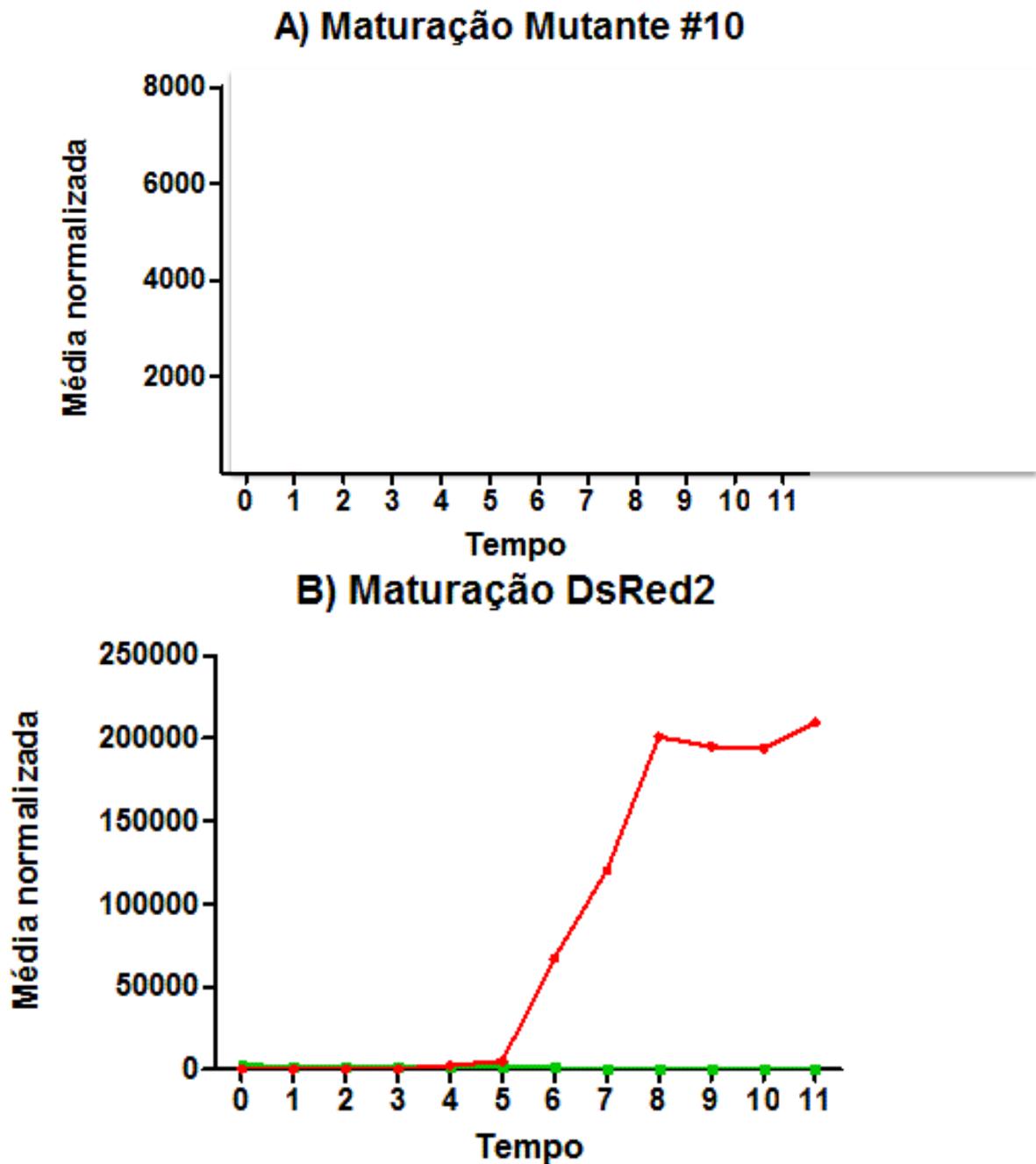


**Figura 17-** Espectro de emissão e excitação para a proteína mutante #10 e a proteína DsRed2 A) Proteína Mutante com xxx máximos de emissão em xxx nm e xxx nm quando excitada em xxx nm e xxx nm, respectivamente. B) Proteína DsRed2 com um pico máximo de emissão em 583 nm quando excitada a 558 nm.

#### 4.4 Cinética da maturação

A maturação da proteína mutante #10 e DsRed2 (controle) foi medida pela absorvância e fluorescência durante 96 h, após a indução com IPTG. Devido ao fato da mutante #10 apresentar xxxxx. A fluorescência foi medida em xxxx comprimento de onda de emissão e excitação. As leituras foram feitas em triplicada, posteriormente foi calculada a média e o desvio padrão e os dados foram normalizados pela absorvância, posteriormente, os resultados foram graficados.

Para detecção da fluorescência xxxxx, a mutante #10 foi avaliada em um comprimento de onda de excitação de xxxnm e emissão de xxxxx nm, onde essa proteína apresentou xxxxx em todos os tempos avaliados. Em seguida, para detecção da fluorescência xxxx foi utilizada uma excitação de xxx nm e emissão de xxxx nm, onde a mutante #10 mostrou xxxxx após xxxx de indução (Figura 18A). Da mesma forma, a proteína DsRed2 (controle) foi avaliada nos mesmos comprimentos de onda de excitação de xxx nm e emissão de xxx nm (para detecção da fluorescência verde), no qual esta proteína não apresentou nenhum sinal de fluorescência. No comprimento de onda de excitação de xxx nm e emissão de xxxx nm (para detecção da fluorescência vermelha) a fluorescência começa a ser visível após 12 h de indução, mostrando seu pico máximo de fluorescência em 45 h (Figura 18B).

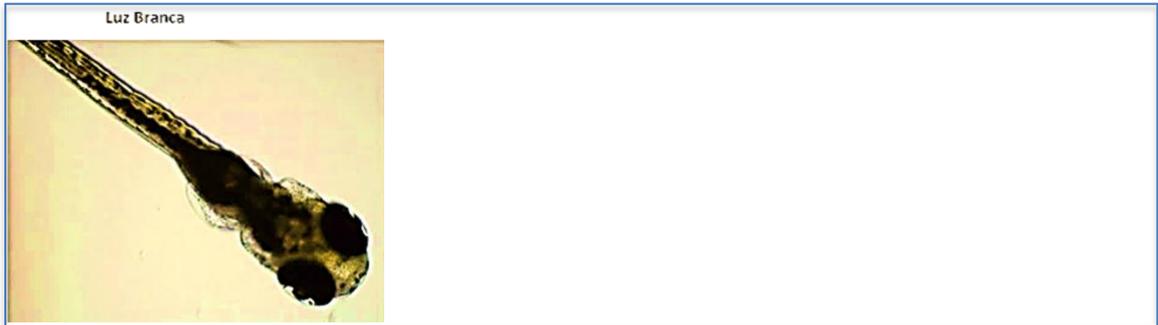


**Figura 18-** Cinética da maturação das proteínas. Avaliação da fluorescência em **A)** Mutante #10 e **B)** DsRed2, coletadas em diferentes tempos (0=0 h, 1=0,5 h, 2=3 h, 3= 6 h, 4= 9 h, 5= 12 h, 6= 24 h, 7= 30 h, 8= 45 h, 9= 48 h, 10= 72 h, 11= 96 h) após a indução da expressão com Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

#### 4.5 Peixes transgênicos

O fragmento linear xxxxx foi microinjetado com sucesso em ovos de *zebrafish*, num percentual de transgenia de 60%. O padrão de expressão apresentado foi moderado (menos do 50% do corpo apresenta fluorescência, de acordo com Figueiredo *et al.* 2007). Da mesma forma que observado em *E. coli* expressando a mutante #10 (Figura 14), as

larvas transgênicas também apresentaram xxxxxxxx (Figura 19). Resultado que ratifica em células *in vivo* a presença da xxxxxxxxxxx da variante mutante #10.



**Figura 19-** Larvas de peixes *zebrafish* transgênicos expressando a proteína mutante #10.

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho revelou a produção de uma nova variante da proteína DsRed2 com xxxxxxxx. Os resultados do espectro de emissão e excitação, além da taxa de maturação da proteína controle DsRed2 obtidos no presente trabalho, foram semelhantes aos resultados relatados por Bevis & Glick (2002), mostrando que as metodologias utilizadas foram adequadas para caracterizar a proteína mutante #10. A taxa de maturação das proteínas tetrâmeras tem sido pouco avaliada, porém, a taxa de maturação da mutante #10 foi xxxxx, que é considerada a variante com uma taxa de maturação mais rápida (Bevis & Glick 2002). A DsRed demora aproximadamente 20 h, após a indução, para ser detectada a fluorescência vermelha (Jakobs *et al.* 2000). A mutante #10 e a DsRed2 foram detectadas após xxx de indução. Portanto, a mutante #10 além de apresentar xxxx, possui a vantagem de ter uma taxa de maturação xxxxxxxx.

Na engenharia das proteínas fluorescentes, inúmeras variantes dessas proteínas têm sido desenvolvidas com alterações de sua sequência de aminoácidos. Essas alterações resultaram em mudanças nas características dessas proteínas, como aumento de foto-estabilidade, aumento de brilho, menor tempo de maturação, rápida degradação e, muitas vezes, alteração no espectro de excitação e emissão de fluorescência.

Dentre essas mudanças, têm sido relatadas variantes com alteração do espectro de emissão do vermelho para o verde, sendo o caso da variante da DsRed AG4, reportada por Terskikh *et al.* (2002). A DsRed2 AG4 apresentou três mutações (V71M, V105A, S197T), as quais fizeram com que a proteína que antes era considerada uma proteína vermelha fluorescente, passasse a ser detectada somente no espectro de emissão verde (emissão máxima em 479 nm). Os autores discutem esta mudança de fluorescência com respeito à substituição do aminoácido valina para metionina na posição 71 (V71M) devido ao fato deste resíduo se encontrar perto da molécula do cromóforo (Gly66, Tyr67, Gln68). Os autores sugerem que essa substituição gerou uma distorção estrutural ao redor do cromóforo, produzindo a maturação incompleta do cromóforo vermelho e favorecendo a fluorescência verde. Um resultado semelhante foi encontrado por Eli & Chakrabartty (2006), no qual os autores relatam, da mesma forma, uma variante da proteína DsRed chamada de gRF, a qual foi detectada tanto no espectro de emissão verde como no vermelho, sendo a emissão verde apresentada com maior intensidade de fluorescência. Esta mudança de comportamento foi devido às alterações dos aminoácidos V71M, K163H e S197Y. As duas variantes da DsRed citadas anteriormente, compartilham as alterações nos aminoácidos V71 e S197, o que leva a formular a hipótese que esses dois

aminoácidos podem estar envolvidos na mudança de fluorescência de vermelho para verde na proteína DsRed. Porém, cabe ressaltar que a proteína mutante #10 reportada no presente trabalho, xxxxxxxx, não apresenta estas alterações de aminoácidos.

Levando em consideração que a variante AG4 e gRF compartilham a mutação V71M e que, segundo Shaner (2014), as substituições de aminoácidos ao redor do cromóforo frequentemente influenciam nas propriedades ópticas da proteína mutante resultante, podemos levantar a hipótese que a alteração xxxxxx presente na mutante #10 pode estar relacionada ao comportamento de xxxxxx desta variante.

Por outro lado, Terskikh *et al.* (2000) descreveu uma variante da proteína DsRed que possui mudanças no espectro de emissão da fluorescência ao longo do tempo. Proteínas com esta característica recebem o nome de “*Fluorescent timer*”, mudando de verde para o vermelho de acordo com o estado de maturação da proteína. Essa variante possui as mutações V105A e S197T. Os autores avaliaram as mutações em separado, encontrando que a mutação V105A não altera a fluorescência vermelha da proteína, enquanto a mutação S197T permite à proteína apresentar as mudanças no espectro de emissão da fluorescência. Sendo a mutação deste aminoácido comum nas variantes AG4 e gRF citadas anteriormente, uma segunda hipótese pode ser considerada. Estabelecendo que não só as mutações nos aminoácidos próximos ao cromóforo podem gerar mudanças nas propriedades espectrais das proteínas fluorescentes, mas as interações entre esses aminoácidos na estrutura da proteína poderiam também estar envolvidas. Considerando esta segunda hipótese, poderíamos ressaltar que xxx das mutações gerada na mutante #10 incluíram uma mudança no número de aminoácidos polares e não polares na proteína. A xxxx foi substituída por xxxx na posição xxxx, onde a xxxx corresponde a um aminoácido polar (hidrofílico) e a xxxx a um aminoácido não polar (hidrofóbico). Essa mudança provavelmente causou mudanças no ângulo das interações atômicas na proteína, que podem causar diferenças no comprimento de onda de excitação e emissão de proteína (Volkenstein 1965).

A mutante #10 apresenta xxxx emissão de fluorescência atribuída possivelmente a alterações na estrutura da proteína. Esta característica de xxxx emissão de fluorescência não foi descrita anteriormente para uma variante da proteína DsRed2. Entretanto, resultados semelhantes em outras proteínas fluorescentes não vermelha foram reportados. Hanson *et al.* (2002), através de mutagênese dirigida, conseguiram uma proteína variante da GFP chamada de deGFPs, a qual foi desenvolvida com o intuito de ser utilizada como sensor de pH, uma vez que esta proteína emite fluorescência azul em uma solução com

pH 6 e verde em uma solução com pH 9. Assim, os autores definem a dupla emissão como emissão 460 nm e 515 nm, com intensidades relativas dependendo do pH. De outro modo, Wiedenmann *et al.* (2004) reportaram que a proteína chamada EosFP emite fluorescência verde (516 nm) que pode ser mudada para vermelha (581 nm) quando exposta à radiação UV (390 nm). Isto ocorre devido a uma modificação fotoinduzida envolvendo uma ruptura na estrutura do peptídeo ao lado do cromóforo. Cabe ressaltar que a proteína mutante #10 não necessita estar xxxx para apresentar a característica xxxxxx.

O mecanismo de formação do cromóforo na proteína DsRed já foi descrito, mostrando que este apresenta o cromóforo das proteínas verde fluorescentes como a GFP, em um estado de maturação incompleta. Portanto, uma reação de oxidação adicional leva à proteína DsRed a apresentar um cromóforo que emite fluorescência vermelha (Gross *et al.* 2000, Wall *et al.* 2000, Miyawaki *et al.* 2003). Sendo assim, poderíamos considerar que o comportamento da mutante #10 de apresentar xxxx estaria associado a diferentes estados de maturação do cromóforo. Em comparação, a variante K70M descrita por Tubbs *et al.* (2005) perdeu a capacidade de emitir a fluorescência vermelha provavelmente pela interrupção do processo de maturação do cromóforo causada pela substituição de um aminoácido muito próximo do cromóforo. Da mesma forma, as variantes da DsRed V71M (Eli & Chakrabarty 2006) e Y67W (Shaner *et al.* 2004), também perderam a capacidade de emitir na faixa do vermelho, apresentando apenas a fluorescência verde.

Já está estabelecido que mutações nos aminoácidos perto ao cromóforo podem gerar mudanças nas características espectrais das proteínas fluorescentes, incluindo a perda completa da fluorescência. No caso da mutante #10, uma mutação xxxx não só não afetou a fluorescência original vermelha, como possivelmente esteja relacionada com o xxxxxx. Tubbs *et al.* (2005) menciona (como dado não publicado) que a mutação xxxx não tem uma função direta na maturação do cromóforo, mas que pode potencializar este processo. De fato, a substituição de um aminoácido hidrofílico por um hidrofóbico nesta posição pode ter mantido o cromóforo em um estado intermediário de maturação. Neste caso, o cromóforo pode adquirir uma isomerização *cis* ou *trans* de acordo ao comprimento de onda excitado, permitindo assim a absorção de luz nos dois comprimento de onda, levando à emissão xxxxxxx. Este comportamento não parece impossível de ser alcançado, uma vez que Habuchi *et al.* (2005) relataram evidências de isomerização e descarboxilação na fotoconversão da DsRed, que levam à proteína do vermelho normal

para um estado de vermelho extremamente intenso. Os autores demonstram que a foto-conversão é o resultado de alterações estruturais (isomerização *cis-trans*) do cromóforo e a descarboxilação de um glutâmico (E215) que não interage diretamente com o cromóforo. De fato, já têm sido relatados cromóforos reversíveis por fotoconversão, nos quais a luz induz a isomerização do grupo p-hidroxibencilideno entre dois estados *cis-trans*, levando as proteínas de um estado fluorescente para um estado não fluorescente. Proteínas fluorescentes com estas características especiais abrem novas possibilidades para microscopia de super-resolução (Prescott *et al.* 2006, Subach & Verskhusha 2012, Shcherbakova & Verskhusha 2014).

De um modo geral, o presente trabalho salienta a importância da obtenção de uma nova proteína com xxxxx emissão de fluorescência, uma vez que diversas metodologias utilizam proteínas fluorescentes como marcadores. Por exemplo, uma proteína apresentando xxxx fluorescência supera a limitação de disponibilidade de filtros, sendo que, seria necessário um único filtro xxxx para ser detectada. Por outro lado, em experimentos com células *in vivo* reduziria o risco de ser confundida com fluorescência endógena de tecidos ou organelas, uma vez que, apresenta xxxxx possibilidades de fluorescência como proteína marcadora. Finalmente, na piscicultura ornamental esta proteína poderia representar uma novidade interessante. Não é difícil imaginar que um peixe com xxxxx fluorescência poderia mudar de cor simplesmente através da utilização de combinações de LEDs (do inglês *Light Emitting Diode*) colocados estrategicamente em locais diferentes do aquário e excitando a proteína com diferentes comprimentos de onda. É possível que a mutante #10 possa ser a primeira de uma nova família de proteínas xxxxxx e abrir um campo novo e promissor na piscicultura ornamental através da produção de peixes xxxxx com valor agregado ainda a ser calculado.

## 6. CONCLUSÕES

- (i) As condições da epPCR utilizadas no presente trabalho são adequadas para gerar mutações randômicas e produzir variantes da proteína fluorescentes DsRed2;
- (ii) Uma nova variante da proteína vermelha fluorescentes (DsRed2) foi produzida, a qual apresenta xxxx emissão de fluorescência;
- (iii) O fragmento linear xxxxx é efetivo para a produção de *zebrafish* transgênico fluorescentes;

## 7. PERSPECTIVAS

- (i) Produção de sub-variantes da proteína mutante #10;
- (ii) Produção de uma linhagem estável (F1) de *zebrafish* transgênico com dupla fluorescência;
  - Cruzamento da geração F0 com *zebrafish* não transgênico (selvagem);
  - Avaliação da transmissão de fluorescência da linhagem (F1);
  - Análises dos parâmetros reprodutivos da linhagem.
- (iii) Definição da estrutura tridimensional da proteína mutante #10;
- (iv) Desenvolvimento do aquário apropriado para visualização da xxxx emissão de fluorescência da linhagem produzida;
- (v) Produção de novas variantes de peixes ornamentais fluorescentes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, H, W, JN HENDERSON, SJ REMINGTON & RE CAMPBELL. 2006. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem. J.*, 400: 531–540.
- AI, H, W, NC SHANER, Z CHENG, RY TSIEN & RE CAMPBELL. 2007. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. *Biochem.*, 46: 5904-5910.
- AI, H, W, SG OLENYCH, P WONG, MW DAVIDSON & RE CAMPBELL. 2008. Hue-shifted monomeric variants of *Clavularia* cyan fluorescent protein: identification of the molecular determinants of color and applications in fluorescence imaging. *BMC Biol.*, 6: 1-13.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LOJAS DE AQUARIOFILIA (ABLA). 2016. Disponível em: [http://ablaquariofilia.com.br/site/index.php?option=com\\_content&view=article&id=159:piscicultura-ornamental-cresce-com-as-novas-tecnologias&catid=45:noticias&Itemid=55](http://ablaquariofilia.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=159:piscicultura-ornamental-cresce-com-as-novas-tecnologias&catid=45:noticias&Itemid=55). Acesso em 13/01/2016.
- BAIRD, G, S, DA ZACHARIAS & RY TSIEN. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS.*, 97: 11984–11989.
- BANSAL, L, R NELSON, E YANG, A JAYARAMAN & J HAHN. 2013. Experimental design of systems involving multiple fluorescent protein reporters. *Chem. Eng. Sci.*, 101: 191–198.
- BARTLEY, D. 2005. In FAO Fisheries and aquaculture department: Ornamental fish. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/13611/>. Acesso em: 13/01/2016
- BEVIS, B, J & BS GLICK. 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.*, 20: 83-87.

- CAMPBELL, R, E, O TOUR, AE PALMER, PA STEINBACH, GS BAIRD, DA ZACHARIAS & RY TSIEN. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *PNAS.*, 11: 7877–7882.
- CHALFIE, M, Y TU, G EUSKIRCHEN, WW WARD & DC PRASHER. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 803-805.
- CHOU, C, Y, LS HORNG & HJ TSAI. 2001. Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Res.*, 10: 303–315.
- CHU, J, RD HAYNES, SY CORBEL, P LI, EG GONZÁLEZ, JS BURG, NJ ATAIE, AL LAM, PJ CRANFILL, MA BAIRD, MW DAVIDSON, HL NG, KC GARCIA, CH CONTAG, K SHEN, HM BLAU & MZ LIN. 2014. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat. Methods.*, 5: 572-583.
- CHUDAKOV, D, M, MV MATZ, S LUKYANOV & KA LUKYANOV. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev.*, 90: 1103–1163.
- CIRINO, P, C, KM MAYER & D UMENO. 2003. Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR. In: ARNOLD, F, H & G, GORGIOU (ed). *Methods in Molecular Biology: Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, Humana Press Inc., Totowa. Chap. 1: 3-7.
- CORMACK, B, P, RH VALDIVIA & S FALKOW. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173: 33-38.
- CORLAN, A, D. Medline trend: automated yearly statistics of Pubmed results for any query. 2016. Disponível em: URL:<http://dan.corlan.net/medline-trend.html>. Acesso em: 13/01/2016.
- DAHM R & JR GEISLER. 2006. Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol.*, 8: 329–345.

- DAMMSKI, A, P, BR MÜLLER, C GAYA & D REGONATO. 2011. Zebrafish: Manual de criação em biotério. Curitiba, UFPR. 107p.
- DAY, R, N & MW DAVIDSON. 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.*, 38: 2887–2921.
- ELI, P & A CHAKRABARTTY. 2006. Variants of DsRed Fluorescent Protein: Development of a Copper Sensor. *Protein. Sci.*, 15: 2442–2447.
- EVDOKIMOV, A, G, ME POKROSS, NS EGOROV, AG ZARAIKY, IV YAMPOLSKY, EM MERZLYAK, AN SHKOPOROV, L SANDER, KA LUKYANOV & DM CHUDAKOV. 2006. Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO. Reports.*, 10: 1006-1012.
- FRADKOV, A, F, L DING, EV BARSOVA, MV MATZ & SA LUKYANOV. 2000. Novel Fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett.*, 479: 127-130.
- FRADKOV, A, F, VV VERKHUSHA, DB STAROVEROV, ME BULINA, YG YANUSHEVICH, VI MARTYNOV, S LUKYANOV & KA LUKYANOV. 2002. Far-red fluorescent tag for protein labelling. *Biochem. J.*, 368: 17-21.
- FIGUEIREDO, M, A, CFC LANES, DV ALMEIDA & LF MARINS. 2007. Improving the production of transgenic fish germlines: In vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.*, 30: 31-36.
- FIGUEIREDO, M, A, EA MARECO, MDP SILVA & LF MARINS. 2012. Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic Res.*, 21: 457–469.
- GLOFISH WEBSITE. 2015. Disponível em: <https://www.glofish.com/>. Acesso em: 02/02/2015.

- GOEDHART, J, LV WEEREN, MA HINK, NOE VISCHER, K JALINK & TWJ GADELLA JR. 2010. Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat. Methods.*, 2: 137-140.
- GONG, Z, N, H WAN, TL TAY, H WANG, M CHEN & T YAN. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308: 58–63.
- GRIESBECK, O, GS BAIRD, RE CAMPBELL, DA ZACHARIAS & RY TSIEN. 2001. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein: mechanism and applications. *J. Biol. Chem.*, 276: 29188–29194.
- GROSS, L, A, GS BAIRD, RC HOFFMAN, KK BALDRIDGE & RY TSIEN. 2000. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS.*, 24: 11990–11995.
- GURSKAYA, N, G, AP SAVITSKY, YG YANUSHEVICH, SA LUKYANOV & KA LUKYANOV. 2001. Color transitions in coral's fluorescent proteins by site-directed Mutagenesis. *BMC. Biochem.*, 2-6.
- GURSKAYA, N, G, AF FRADKOV, NI POUNKOVA, DB STAROVEROV, ME BULINA, YG YANUSHEVICH, YA LABAS, S LUKYANOV & KA LUKYANOV. 2003. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants. *Biochem. J.*, 373: 403–408.
- HABUCHI, S, M COTLET, T GENSCH, T BEDNARZ, S HABER-POHLMEIER, J ROZENSKI, G DIRIX, J MICHIELS, J VANDERLEYDEN, J HEBERLE, FCD SCHRYVER & JOHAN HOFKENS. 2005. Evidence for the isomerization and decarboxylation in the photoconversion of the red fluorescent protein DsRed. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 8977-8984.

- HANSON, G, T, TB MCANANEY, ES PARK, MEP RENDELL, DK YARBROUGH. 2002. Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors structural characterization and preliminary application. *Biochem.*, 41: 15477-15488.
- HEIM, R, DC PRASHER & RY TSIEN. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *PNAS.*, 91: 12501-12504.
- HEIM, R & RY TSIEN. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, 6:178–182
- HENSE A, K NIENHAUS & GU NIENHAUS. 2015. Exploring color tuning strategies in red fluorescent proteins. *Photobiol. Sci.*, 14: 200-212.
- HOI, H, ES HOWE, Y DING, W ZHANG, MA BAIRD, BR SELL, JR ALLEN, MW DAVIDSON & RE CAMPBELL. 2013. An engineered monomeric *Zoanthus* sp. yellow fluorescent protein. *Chem. Biol.*, 20: 1296–1304.
- JAKOBS, S, V SUBRAMANIAM, A SCHONLE, TM JOVIN & SW HELL. 2000. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS. Lett.*, 479: 131-135.
- JONES, A, M, DW EHRHARDT & WB FROMMER. 2012. A never ending race for new and improved fluorescent proteins. *BMC. Biol.*, 10: 1-3.
- JY LIN TRADING CO., LTDA WEBSITE. 2015. Disponível em: [http://www.ornamentalfish.com.tw/index.asp?au\\_id=49&sub\\_id=77&id=636](http://www.ornamentalfish.com.tw/index.asp?au_id=49&sub_id=77&id=636). Acesso em: 02/02/2015.
- KARASAWA, S, T ARAKI, M YAMAMOTO & A MIYAWAKI. 2003. A Green-emitting Fluorescent Protein from *Galaxeidae* Coral and Its Monomeric. *J. Biol. Chem.*, 278: 34167–34171.

- KARASAWA, S, T ARAKI, T NAGAI, H MIZUNO & A MIYAWAKI. 2004. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem. J.*, 381: 307–312.
- KAWAKAMI, K. 2007. *Tol2*: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.*, 8: 1-10.
- KLASEN, M & M WABL. 2004. Silent point mutation in DsRed resulting in enhanced relative fluorescence Intensity. *Biotechniques.*, 36: 236–238.
- KNOP, M, F BARR, CG RIEDEL, T HECKEL & C REICHEL. 2002. Improved version of the red fluorescent protein (dRFP583/DsRed/RFP). *Biotechniques.*, 33: 592-602.
- KOGURE, T, S KARASAWA, T ARAKI, K SAITO, M KINJO & A MIYAWAKI. 2006. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat. Biotechnol.*, 24: 577-581.
- KREDEL, S, K NIENHAUS, F OSWALD, M WOLFF, S IVANCHENKO, F CYMER, A JEROMIN, FJ MICHEL, KD SPINDLER, R HEILKER, GU NIENHAUS & J WIEDENMANN. 2008. Optimized and far-red-emitting variants of fluorescent protein eqfp611. *Chem. Biol.*, 15: 224–233.
- KREDEL, S, F OSWALD, K NIENHAUS, K DEUSCHLE, C ROCKER, M WOLFF, R HEILKER, GU NIENHAUS, J WIEDENMANN. 2009. mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. *PLoS ONE.*, 4: 1-7.
- KREMERS, G, J, J GOEDHART, EB VAN MUNSTER & TWJ GADELLA JR. 2006. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET forster radius. *Biochem.*, 45: 6570-6580.
- LAM, A, J, F ST PIERRE, Y GONG, JD MARSHALL, PJ CRANFILL, MA BAIRD, MR MCKEOWN, J WIEDENMANN, MW DAVIDSON, MJ SCHNITZER, RY TSIEN & MZ LIN. 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods.*, 10: 1005-1017.

- LANES, C, F, C, DV ALMEIDA, MA FIGUEIREDO, LFF MARINS & AWS HILSDORF. 2014. A transgenia na aquicultura realidade ou ficção? *Panorama da Aquicultura*, 143: 26-33.
- LAWRENCE, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269: 1–20.
- LEHNINGER, A, L & MM COX. 2006. Amino Acids, Peptides, And Proteins. In: LEHNINGER, A, L & MM COX. Fundamentos de bioquímica. Omega, Chap. 3: 75-106.
- LIN, M, Z, MR MCKEOWN, H, L NG, TA AGUILERA, NC SHANER, RE CAMPBELL, SR ADAMS, LA GROSS, W MA, T ALBER & RY TSIEN. 2009. Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals. *Chem. Biol.*, 16: 1169–1179.
- MAGALHÃES, A, L, B, NPU BARBOSA & CM JACOBI. 2009. Peixes de aquário: Animais de estimação ou pestes. *Ciência Hoje*, 45: 40-45.
- MATZ, M, V, AF FRADKOV, YA LABAS, AP SAVITSKY, AG ZARAIISKY, ML MARKELOV & SA LUKYANOV. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat. Biotechnol.*, 17: 969-973.
- MELAMED, P, Z GONG, G FLETCHER & CL HEW. 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204: 255–269.
- MENA, M, A, TP TREYNOR, SL MAYO & PS DAUGHERTY. 2006. Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library. *Nat. Biotechnol.*, 12: 1569-1571.
- MERZLYAK, E, M, J GOEDHART, D SHCHERBO, ME BULINA, AS SHCHEGLOV, AF FRADKOV, A GAINZEVA, KA LUKYANOV, S LUKYANOV, TWJ GADELLA & DM CHUDAKOV. 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods.*, 7: 555-557.

- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/legislacao/instrucoes-normativas/instrucoes-normativas-2014>. Acesso em 20/01/2016.
- MIYAWAKI, A, O GRIESBECK, R HEIM & RY TSIEN. 1999. Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *PNAS. USA.*, 96: 2135–2140.
- MIYAWAKI, A, T NAGAI & H MIZUNO. 2003. Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7: 557–562.
- MIYAWAKI, A, DM SHCHERBAKOVA & VV VERKHUSHA. 2012. Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 22: 679–688.
- MOROZOVA, K, S, KD PIATKEVICH, TJ GOULD, J ZHANG, J BEWERSDORF & VV VERKHUSHA. 2010 Far-Red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution sted nanoscopy. *Biophys. J.*, 99: L13–L15.
- NAGAI, T, K IBATA, ES PARK, M KUBOTA, K MIKOSHIBA & A MIYAWAKI. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.*, 20: 87-90.
- NGUYEN A, W & PS DAUGHERTY. 2005. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.*, 3: 355-360.
- NIEMANN, H & WA KUES. 2007. Transgenic farm animal: an update. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19: 762-770.
- ORMO, M, AB CUBITT, K KALLIO, LA GROSS, RY TSIEN & SJ REMINGTON. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273: 1392-1395.

- PAN, X, H ZHANG & Z GONG. 2008. Ornamental expression of red fluorescent protein in transgenic founders of white skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). *Mar Biotechnol.*, 10: 497–501.
- PARAJO, M, F, M KOOPMAN, EMHP VAN DIJK, V SUBRAMANIAM & NF VAN HULST. 2001. The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *PNAS.*, 98: 14392–14397.
- PATTERSON, G, H, SM KNOBEL, WD SHARIF, SR KAIN & DW PISTON. 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 73: 2782-2790.
- PATTERSON, G, RN, DAY & D PISTON. 2001. Fluorescent protein spectra. *J. Cell. Sci.*, 114: 837-838.
- PIATKEVICH, K, D, J HULIT, OM SUBACH, B WU, A ABDULLA, JE SEGALL & VV VERKHUSHA. 2010. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. *PNAS.*, 12: 5369–5374.
- PIATKEVICH, K, D, VN MALASHKEVICH, KS MOROZOVA, NA NEMKOVICH, SC ALMO & VV VERKHUSHA. 2013. Extended stokes shift in fluorescent proteins: chromophore–protein interactions in a near-infrared TagRFP675 variant. *Sci. Rep.*, 3: 1-7.
- PLETNEVA N, V, VZ PLETNEV, E SOUSLOVA, DM CHUDAKOV, S LUKYANOV, VI MARTYNOV, S ARHIPOVA, I ARTEMYEV, A WLODAWER, Z DAUTER & S PLETNEV. 2013. Yellow fluorescent protein PhiYFPv (*Phialidium*): structure and structure-based mutagenesis. *Acta. Cryst.*, 69: 1005–1012.
- PLOEG, A. 2013. The status of the ornamental aquatic industry. *Journal Ornamental Fish International*, 72: 11-13.

- PRASHER, D, C, VK, ECKENRODE, WW, WILSON, FG, PRENDERGAST & MJ CORMIER. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-233.
- PRESCOTT, M, J BATTAD, P WILMANN, J ROSSJOHN & R DEVENISH. 2006. Recent advances in all-protein chromophore technology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 12: 31-66.
- PRITCHARD, L, D CORNE, D KELL, J ROWLAND & M WINSON. 2005. A general model of error-prone PCR. *J. Theor. Biol.*, 234: 497–509.
- QUAN, J & J TIAN. 2011. Circular polymerase extension cloning for high throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat. Protoc.*, 2: 242-251.
- RAO, J, C, S, G SIMHACHALAM & CHS RAJU. 2013 Ornamental fish diversity of Lake Kolleru, the only Ramsar site in Andhra Pradesh, India. *BEPLS.*, 2: 48-55.
- REYNOSO, FL, MC CHÁVEZ, JEZ C, GH ZÁRATE, MAR BARRAGÁN & ES MORAN. 2012. La acuariofilia de especies ornamentales marinas: un mercado de retos y oportunidades. *LAJAR.*, 40: 12-21.
- RIBAS, L & F PIFERRER. 2013. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev. Aquaculture.*, 5: 1–32.
- RIBEIRO, F, A, S. MT LIMA & CJBK FERNANDES. 2010. Panorama Do Mercado De Organismos Aquáticos Ornamentais. *Boletim Ablimno.*, 38: 1-15.
- RIZZO, M, A, GH SPRINGER, B GRANADA & DW PISTON. 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.*, 4: 445-449.
- SACCHETTIA, A, V SUBRAMANIAM, TM JOVIN & S ALBERTI. 2002. Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Lett.*, 525: 13-19.

- SAKAUE-SAWANO, A, H KUROKAWA, T MORIMURA, A HANYU, H HAMA, H OSAWA, S KASHIWAGI, K FUKAMI, T MIYATA, H MIYOSHI, T IMAMURA, M OGAWA, H MASAI & A MIYAWAKI. 2008. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell.*, 132: 487–498.
- SECEX. 2016. SISTEMA DE ANÁLISE DE INFORMAÇÕES DO COMÉRCIO EXTERIOR– ALICEWEB. Disponível em: <http://www.aliceweb.gov.br>. Acesso em 01/02/2016.
- SHAGIN, D, A, EV BARSOVA, YG YANUSHEVICH, AF FRADKOV, KA LUKYANOV, YA LABAS, TN SEMENOVA, JA UGALDE, A MEYERS, JM NUNEZ, EA WIDDER, SA LUKYANOV & MV MATZ. 2004. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.*, 2: 841-849.
- SHANER, N, C, RE CAMPBELL, PA STEINBACH, BNG GIEPMANS, AE PALMER & RY TSIEN. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572.
- SHANER N, C, PA STEINBACH & RY TSIEN. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.*, 12: 905-909.
- SHANER, N, C, GH PATTERSON & MW DAVIDSON. 2007. Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell. Sci.*, 120: 4247-4260.
- SHANER, N, C, MZ LIN, MR MCKEOWN, PA STEINBACH, KL HAZELWOOD, MW DAVIDSON & RY TSIEN. 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods.*, 5: 545–551.
- SHANER, N, C. 2014. Development of new colors from corals fluorescent protein. In: DAY, R, M & MW DAVIDSON (ed.). *The fluorescent protein revolution*. CRC Press, Londres, Chap. 4: 71-94.

- SHCHERBO, D, EM MERZLYAK, TV CHEPURNYKH, AF FRADKOV, GV ERMAKOVA, EA SOLOVIEVA, KA LUKYANOV, EA BOGDANOVA, AG ZARAIKY, S LUKYANOV & DM CHUDAKOV. 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole body imaging. *Nat. Methods.*, 9: 741-746.
- SHCHERBO, D, CS MURPHY, GV ERMAKOVA, EA SOLOVIEVA, TV CHEPURNYKH, AS SHCHEGLOV, VV VERKHUSHA, VZ PLETNEV, KL HAZELWOOD, PM ROCHE, S LUKYANOV, AG ZARAIKY, MW DAVIDSON & DM CHUDAKOV. 2009. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem. J.*, 3: 567–574.
- SHCHERBAKOVA, D, M, MA HINK, L JOOSEN, TWJ GADELLA & VV VERKHUSHA. 2012. An orange fluorescent protein with a large stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 134: 7913–7923.
- SHCHERBAKOVA, D, M & VV VERKHUSHA. 2014. Chromophore chemistry of fluorescent proteins controlled by light. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 20: 60–68.
- SHEN, Y, T LAI & RE CAMPBELL. 2015. Red fluorescent proteins (RFPs) and RFP-based biosensors for neuronal imaging applications. *Neurophotonics.*, 2: 1-12.
- SHEMIAKINA, I, I, GV ERMAKOVA, PJ CRANFILL, MA BAIRD, RA EVANS, EA SOUSLOVA, DB STAROVEROV, AY GOROKHOVATSKY, EV PUTINTSEVA, TV GORODNICHEVA, TV CHEPURNYKH, L STRUKOVA, S LUKYANOV, AG ZARAIKY, MW DAVIDSON, DM CHUDAKOV & D SHCHERBO. 2012. A monomeric red fluorescent protein with low Cytotoxicity. *Nat. Commun.*, 3: 1-7.
- SHIMOMURA O. 2009. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int.*, 48: 5590 – 5602.
- SHKROB, M, A, YG YANUSHEVICH, DM CHUDAKOV, NG GURSKAYA, YA LABAS, SY POPONOV, NN MUDRIK, S LUKYANOV & KA LUKYANOV. 2005.

Far red fluorescent proteins evolved from a blue chromoprotein from *Actinia equina*. 2005. *Biochem. J.*, 392: 649–654.

SILVA, A, C, DV ALMEIDA, MA FIGUEIREDO & LF MARINS. 2015. Double Transgenic Zebrafish for Somatotrophic Axis: A Tool for Muscle Development and Growth Studies. *Zebrafish*. 12: 1.

STEPANENKO, O, V, OV STEPANENKO, IM KUZNETSOVA, VV VERKHUSHA & KT TUROVEROV. 2013. Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore formation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, 302: 221-278.

STRACK, R, L, DE STRONGIN, D BHATTACHARYYA, W TAO, A BERMAN, HE BROXMEYER, RJ KEENAN & BS GLICK. 2008. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat. Methods.*, 5: 955-957.

SUBACH, O, M, IS GUNDOROV, M YOSHIMURA, FV SUBACH, J ZHANG, D GRUENWALD, EA SOUSLOVA, DM CHUDAKOV & VV VERKHUSHA. 2008. Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Chem. Biol.*, 15: 1116–1124.

SUBACH, O, M, GH PATTERSON, L-M TING, Y WANG, JS CONDEELIS & VV VERKHUSHA. 2011. A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange. *Nat. Methods.*, 9: 771-781.

SUBACH, O, M, D ENTENBERG, JS CONDEELIS & VV VERKHUSHA. 2012. A FRET-Facilitated photoswitching using an orange fluorescent protein with the fast photoconversion kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, 134: 14789–14799.

SUBACH, F, A & VV VERKHUSHA. 2012. Chromophore transformations in red fluorescent proteins. *Chem. Rev.*, 112: 4308–4327.

TERSKIKH, A, A FRADKOV, GERMAKOVA, A ZARAIISKY, P TAN, AV KAJAVA, X ZHAO, S LUKYANOV, M MATZ, S KIM, I WEISSMAN & P SIEBERT. 2000. Fluorescent timer: protein that changes color with time. *Science.*, 290: 1585-1588.

- TERSKIKH, A, V, AF FRADKOV, AG ZARAISKY, AV KAJAVA & B ANGRES. 2002. Analysis of DsRed mutants: space around the fluorophore accelerates fluorescence development. *J. Biol. Chem.*, 227: 7633–7636.
- TOMOSUGI, W, T MATSUDA, T TANI, T NEMOTO, I KOTERA, K SAITO, K HORIKAWA & T NAGAI. 2009. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nat. Methods.*, 5: 351-353.
- TSIEN, R, Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 509–544.
- TSIEN, R, Y. 2010. Nobel lecture: constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox. *Integr. Biol.*, 2: 77–93.
- TSUTSUI, H, S KARASAWA, Y OKAMURA & A MIYAWAKI. 2008. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat. Methods.*, 8: 683-685.
- TUBBS, J, L, JA TAINER & ED GETZOFF. 2005. Crystallographic Structures of *Discosoma* red fluorescent protein with immature and mature chromophore: linking peptide bond *trans-cis* isomerization and acylimine formation in chromophore maturation. *Biochem.*, 44: 9833-9840.
- UDVADIA, A J & E LINNEY. 2003. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev. Biol.*, 256: 1-17.
- ULLOA, P, E, JF MEDRANO & CG FEIJO. 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Front. Genet.*, 3: 1-6.
- VERKHUSHA, V, V, IM KUZNETSOVA, OV, STEPANENKO, AG ZARAISKY, MM SHAVLOVSKY, KK TUROVEROV & VN UVERSKY. 2003. High Stability of *Discosoma* DsRed As Compared to *Aequorea* EGFP. *Biochemistry.*, 42: 7879-7884.
- VOLSKESTEIN, M, V. 1965. Coding of polar and non polar aminoacids. *Nature.* 294-295.

- WALL, M, A, M SOCOLICH & R RANGANATHAN. 2000. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat. Struct. Biol.*, 12: 1133-1138.
- WANG, L, WC JACKSON, PA STEINBACH & RY TSIEN. 2004. Evolution of new non antibody proteins via iterative somatic hypermutation. *PNAS.*, 48: 16745–16749.
- WIEDENMANN, J, C ELKE, KD SPINDLER & W FUNKE. 2000. Cracks in the b-can: Fluorescent proteins from *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actinaria). *PNAS.*, 19: 14091–14096.
- WIEDENMANN, J, A SCHENK, C ROCKER, A GIROD, K-D SPINDLER & GU NIENHAUS. 2002. A far red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *PNAS.*, 3: 11646–11651.
- WIEDENMANN, J, S IVANCHENKO, F OSWALD, F SCHMITT, C ROCKER, A SALIH, KD SPINDLER & GU NIENHAUS. 2004. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *PNAS.*, 45: 15905–15910.
- WIEHLER, J, JV HUMMEL & B STEIPE. 2001. Mutants of *Discosoma* red fluorescent protein with a GFP-like Chromophore. *FEBS Lett.*, 487: 384-389.
- WILSON, D, S & AD KEEFE. 2000. Random Mutagenesis by PCR. In: TAYLOR, P, G (ed). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Unit. 8.3.1-8.3.9.
- XIA N, S, W-X LUO, J ZHANG, XY XIE, HJ YANG, SW LI, M CHEN & MH NG. 2002. Bioluminescence of *Aequorea macrodactyla*, a Common Jellyfish Species in the East China Sea. *Mar. Biotechnol.*, 4: 155–162.

- YANG, F, LG MOSS & GN PHILLIPS. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 14: 1246-1251.
- YANG, T, T, L CHENG & SR KAIN. 1996. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids. Res.*, 24: 4592–4593.
- YANG, J, L WANG, F YANG, H LUO, L XU, J LU, S ZENG & Z ZHANG. 2013. mBeRFP, an improved large stokes shift red fluorescent protein. *PLOS ONE.*, 6: 1-6
- YARBROUGH, D, RM WACHTER, K KALLIO, MV MATZ & SJ REMINGTON. 2001. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *PNAS.*, 98: 462–467.
- YOUNT, L. 2008. Biotechnology and genetic engineering. Estados Unidos de América, Facts on file. 369p.
- ZACHARIAS, D, A, JD VIOLIN, AC NEWTON & RY TSIEN. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science.*, 296: 913-916.
- ZAPATA-HOMMER, O & O GRIESBECK. 2003. Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP. *BMC. Biotech.*, 3: 1-5.
- ZHU, H & L ZON. 2004. Use of the DsRed Fluorescent Reporter in zebrafish. In: DETRICH, H, ZON L, WESTERFIELD, M. *The Zebrafish: Cellular and Developmental Biology*. Academic press, Chap. 1: 3-12.
- ZUANON, J, A, S, AL SALARO & WM FURUYA. 2011. Produção e nutrição de peixes ornamentais. *R. Bras. Zootec.*, 40: 165-174.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Lista de proteínas fluorescentes e suas características.

| Proteína              | Ex  | Em  | EC (10 <sup>3</sup> ) | QY    | Estrutura        | Referência   |
|-----------------------|-----|-----|-----------------------|-------|------------------|--|
| <b>GFP</b>            | 395 | 509 | 21                    | 0.77  | <b>Dímero</b>    | Chalfie <i>et al.</i> 1994                           |
| <b>Sirius</b>         | 355 | 424 | 15                    | 0.24  | <b>Monômero</b>  | Tomosugi <i>et al.</i> 2009                          |
| <b>Azurite</b>        | 383 | 447 | 26                    | 0.55  | <b>Monômero</b>  | Mena <i>et al.</i> 2006                              |
| <b>EBFP</b>           | 380 | 440 | 29                    | 0.31  | <b>Monômero</b>  | Patterson <i>et al.</i> 1997                         |
| <b>EBFP2</b>          | 383 | 448 | 32                    | 0.56  | <b>Monômero</b>  | Ai <i>et al.</i> 2007, Hein & Tsien 1996             |
| <b>EGFP</b>           | 484 | 507 | 55                    | 0.60  | <b>Monômero</b>  | Cormack <i>et al.</i> 1996, Yang <i>et al.</i> 1996  |
| <b>ECFP</b>           | 434 | 476 | 32.5                  | 0.40  | <b>Monômero</b>  | Heim <i>et al.</i> 1994, Hein & Tsien 1996           |
| <b>CyPet</b>          | 435 | 477 | 35                    | 0.51  | <b>Monômero</b>  | Nguyen & Daugherty 2005                              |
| <b>Cerulean</b>       | 433 | 475 | 36                    | 0.57  | <b>Monômero</b>  | Rizzo <i>et al.</i> 2004                             |
| <b>SCFP</b>           | 433 | 474 | 30                    | 0.50  | <b>Monômero</b>  | Kremers <i>et al.</i> 2006                           |
| <b>EYFP</b>           | 514 | 527 | 84                    | 0.61  | <b>Monômero</b>  | Ormo <i>et al.</i> 1996, Miyawaki <i>et al.</i> 1999 |
| <b>Emerald</b>        | 487 | 509 | 57.5                  | 0.68  | <b>Monômero</b>  | Day & Davidson 2009                                  |
| <b>Topaz</b>          | 514 | 527 | 94.5                  | 0.60  | <b>Monômero</b>  | Tsien, 1998, Chudakov <i>et al.</i> 2010             |
| <b>SYFP2</b>          | 515 | 527 | 101                   | 0.68  | <b>Monômero</b>  | Kremers <i>et al.</i> 2006                           |
| <b>Venus</b>          | 515 | 528 | 92.2                  | 0.57  | <b>Monômero</b>  | Nagai <i>et al.</i> 2002                             |
| <b>Citrine</b>        | 516 | 529 | 77                    | 0.76  | <b>Monômero</b>  | Griesbeck <i>et al.</i> 2001                         |
| <b>Ypet</b>           | 517 | 530 | 104                   | 0.77  | <b>Monômero</b>  | Nguyen & Daugherty 2005                              |
| <b>mAmetrine</b>      | 406 | 526 | 45                    | 0.58  | <b>Monômero</b>  | Ai <i>et al.</i> 2008                                |
| <b>T-Sapphire</b>     | 399 | 511 | 44                    | 0.60  | <b>Monômero</b>  | Zapata Hommer & Griesbeck 2003                       |
| <b>ZsGreen</b>        | 493 | 505 | 43                    | 0.91  | <b>Tetrâmero</b> | Matz <i>et al.</i> 1999                              |
| <b>ZsYellow1</b>      | 529 | 539 | 20                    | 0.65  | <b>Tetrâmero</b> | Matz <i>et al.</i> 1999                              |
| <b>mPapaya1</b>       | 530 | 541 | 43                    | 0.83  |                  | Hoi <i>et al.</i> 2013                               |
| <b>AmCyan1</b>        | 458 | 489 | 39                    | 0.75  | <b>Tetrâmero</b> | Matz <i>et al.</i> 1999                              |
| <b>TagYFP</b>         | 508 | 524 | 64                    | 0.62  | <b>Monômero</b>  | Xia <i>et al.</i> 2002                               |
| <b>PhiYFP</b>         | 525 | 537 | 124                   | 0.39  | <b>Dímero</b>    | Shagin <i>et al.</i> 2004                            |
| <b>PhiYFPv</b>        | 524 | 537 | 101                   | 0.59  |                  | Pletnev <i>et al.</i> 2013                           |
| <b>KO</b>             | 548 | 561 | 110                   | 0.45  |                  | Karasawa <i>et al.</i> 2004                          |
| <b>mKO</b>            | 548 | 559 | 51.6                  | 0.60  | <b>Monômero</b>  | Karasawa <i>et al.</i> 2004                          |
| <b>mKO2</b>           | 551 | 565 | 63.8                  | 0.57  |                  | Sakaue-Sawano <i>et al.</i> 2008                     |
| <b>AsRed2</b>         | 576 | 592 | 61                    | 0.21  | <b>Tetrâmero</b> | Matz <i>et al.</i> 1999                              |
| <b>HcRed1</b>         | 588 | 618 | 20                    | 0.015 | <b>Dímero</b>    | Gurskaya <i>et al.</i> 2001                          |
| <b>eqFP611</b>        | 559 | 611 | 78                    | 0.45  | <b>Tetrâmero</b> | Wiedenmann <i>et al.</i> 2002                        |
| <b>DsRed</b>          | 558 | 583 | 75                    | 0.79  | <b>Tetrâmero</b> | Matz <i>et al.</i> 1999                              |
| <b>DsRed2</b>         | 563 | 582 | 43.8                  | 0.55  | <b>Tetrâmero</b> | Bevis & Glick 2002                                   |
| <b>DsRed-Express</b>  | 555 | 584 | 38                    | 0.51  | <b>Tetrâmero</b> | Bevis & Glick 2002                                   |
| <b>DsRed-Express2</b> | 554 | 591 | 35.6                  | 0.42  | <b>Tetrâmero</b> | Strack <i>et al.</i> 2008                            |
| <b>DsRed Max</b>      | 560 | 589 | 48                    | 0.41  | <b>Tetrâmero</b> | Strack <i>et al.</i> 2008                            |

|                       |     |     |      |      |                  |   |
|-----------------------|-----|-----|------|------|------------------|---|
| <b>DsRed Monomer</b>  | 556 | 586 | 35   | 0.10 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2005                               |
| <b>dTomato</b>        | 554 | 581 | 69   | 0.69 | <b>Dímero</b>    | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>dTomato Tandem</b> | 554 | 581 | 138  | 0.69 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>mRFP1</b>          | 584 | 607 | 50   | 0.25 | <b>Monômero</b>  | Campbell <i>et al.</i> 2002                             |
| <b>mTangerine</b>     | 568 | 585 | 38   | 0.30 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>mCherry</b>        | 587 | 610 | 72   | 0.22 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>mRaspberry</b>     | 598 | 625 | 86   | 0.15 | <b>Monômero</b>  | Wang <i>et al.</i> 2004                                 |
| <b>mPlum</b>          | 590 | 649 | 41   | 0.10 | <b>Monômero</b>  | Wang <i>et al.</i> 2004                                 |
| <b>mStrawberry</b>    | 574 | 596 | 90   | 0.29 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>mOrange</b>        | 548 | 562 | 71   | 0.69 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>mOrange2</b>       | 549 | 565 | 58   | 0.60 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2008                               |
| <b>mBanana</b>        | 540 | 553 | 6    | 0.70 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>mHoneydew</b>      | 487 | 537 | 17   | 12   | <b>Dímero</b>    | Shaner <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>mGrape1</b>        | 595 | 620 |      |      |                  | Tsien 2010  |
| <b>mGrape2</b>        | 605 | 636 |      |      |                  | Tsien 2010  |
| <b>mApple</b>         | 568 | 592 | 95   | 0.49 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2008                               |
| <b>mAG1</b>           | 492 | 505 | 55   | 0.74 |                  | Karasawa <i>et al.</i> 2003                             |
| <b>mRuby</b>          | 558 | 605 | 90   | 0.35 | <b>Monômero</b>  | Kredel <i>et al.</i> 2009                               |
| <b>mRuby2</b>         | 559 | 600 | 11.3 | 0.38 | <b>Monômero</b>  | Lam <i>et al.</i> 2012                                  |
| <b>mKeima</b>         | 440 | 620 | 14.4 | 0.24 |                  | Kogure <i>et al.</i> 2006                               |
| <b>mCardinal</b>      | 604 | 659 | 87   | 0.19 |                  | Chu <i>et al.</i> 2014                                  |
| <b>mKate</b>          | 588 | 635 | 31.5 | 0.28 | <b>Monômero</b>  | Shcherbo <i>et al.</i> 2007                             |
| <b>mKate2</b>         | 588 | 633 | 62.5 | 0.40 | <b>Monômero</b>  | Shcherbo <i>et al.</i> 2009                             |
| <b>mWasabi</b>        | 493 | 509 | 70   | 0.80 | <b>Monômero</b>  | Ai <i>et al.</i> 2008                                   |
| <b>mTurquoise</b>     | 434 | 474 | 30   | 0.84 |                  | Goedhart <i>et al.</i> 2010                             |
| <b>mCFP</b>           | 433 | 475 | 32.5 | 0.40 | <b>Monômero</b>  | Zacharias <i>et al.</i> 2002                            |
| <b>mTFP1</b>          | 462 | 492 | 64   | 0.85 | <b>Monômero</b>  | Ai <i>et al.</i> 2007                                   |
| <b>mBeRFP</b>         | 446 | 611 | 65   | 0.27 |                  | Yang <i>et al.</i> 2013                                 |
| <b>mBlueberry1</b>    | 398 | 452 | 11   | 0.48 | <b>Monômero</b>  | Ai <i>et al.</i> 2007                                   |
| <b>mBlueberry2</b>    | 402 | 467 | 51   | 0.48 | <b>Monômero</b>  | Ai <i>et al.</i> 2007                                   |
| <b>mUKG1</b>          | 483 | 499 | 60   | 0.72 |                  | Tsutsui <i>et al.</i> 2008                              |
| <b>mNeptune</b>       | 600 | 650 | 67   | 0.20 | <b>Dímero</b>    | Lin <i>et al.</i> 2009                                  |
| <b>JRed</b>           | 584 | 610 | 44   | 0.20 | <b>Dímero</b>    | Shagin <i>et al.</i> 2004, Shaner <i>et al.</i> 2005    |
| <b>Sapphire</b>       | 399 | 511 | 29   | 0.64 | <b>Monômero</b>  | Zapata Hommer & Griesbeck 2003                          |
| <b>AceGFP</b>         | 480 | 505 | 50   | 0.55 | <b>Monômero</b>  | Gurskaya <i>et al.</i> 2003                             |
| <b>AcGFP1</b>         | 475 | 505 | 50   | 0.55 |                  | Gurskaya <i>et al.</i> 2003                             |
| <b>Azami Green</b>    | 492 | 505 | 55   | 0.72 | <b>Monômero</b>  | Karasawa <i>et al.</i> 2003                             |
| <b>EmGFP</b>          | 487 | 509 | 57.5 | 0.68 |                  | Chudakov <i>et al.</i> 2010                             |
| <b>CopGFP</b>         | 482 | 502 | 70   | 0.60 | <b>Tetrâmero</b> | Shagin <i>et al.</i> 2004                               |
| <b>Turbo RFP</b>      | 553 | 574 | 92   | 0.67 | <b>Dímero</b>    | Merzlyak <i>et al.</i> 2007                             |
| <b>TurboGFP</b>       | 482 | 502 | 70   | 0.53 | <b>Monômero</b>  | Evdokimov <i>et al.</i> 2006, Shagin <i>et al.</i> 2004 |

|                         |     |     |       |      |                  |                                  |
|-------------------------|-----|-----|-------|------|------------------|----------------------------------|
| <b>TurboFP02</b>        | 574 | 602 | 74.4  | 0.35 |                  | Chudakov <i>et al.</i> 2010      |
| <b>TurboYFP</b>         | 525 | 538 | 105   | 0.53 | <b>Monômero</b>  | Shagin <i>et al.</i> 2004        |
| <b>TagGFP</b>           | 482 | 505 | 58    | 0.59 | <b>Monômero</b>  | Xia <i>et al.</i> 2002           |
| <b>TagGFP2</b>          | 483 | 506 | 56.5  | 0.61 | <b>Monômero</b>  | Subasch <i>et al.</i> 2008       |
| <b>TagRFP</b>           | 555 | 584 | 100   | 0.48 |                  | Merzlyak <i>et al.</i> 2007      |
| <b>TagRFP-T</b>         | 555 | 584 | 81    | 0.41 |                  | Shaner <i>et al.</i> 2008        |
| <b>TagBFP</b>           | 402 | 457 | 52    | 0.63 | <b>Monômero</b>  | Subasch <i>et al.</i> 2008       |
| <b>TagCFP</b>           | 458 | 480 | 37    | 0.57 | <b>Monômero</b>  | Xia <i>et al.</i> 2002           |
| <b>TagRFP</b>           | 555 | 584 | 100   | 0.48 | <b>Monômero</b>  | Merzlyak <i>et al.</i> 2007      |
| <b>TagRFP-T</b>         | 555 | 584 | 81    | 0.41 | <b>Monômero</b>  | Shaner <i>et al.</i> 2008        |
| <b>TagRFP657</b>        | 611 | 657 | 34    | 0.10 |                  | Morozova <i>et al.</i> 2010      |
| <b>TagRFP675</b>        | 598 | 675 | 46    | 0.08 |                  | Piatkevich <i>et al.</i> 2013    |
| <b>LSSmKate2</b>        | 460 | 605 | 26    | 0.17 |                  | Piatkevich <i>et al.</i> 2010    |
| <b>LSSmKate1</b>        | 463 | 624 | 31.2  | 0.08 |                  | Piatkevich <i>et al.</i> 2010    |
| <b>Midori-Ishi Cyan</b> | 472 | 495 | 27.3  | 0.90 | <b>Dímero</b>    | Karasawa <i>et al.</i> 2004      |
| <b>Kusabira Orange</b>  | 548 | 559 | 51.6  | 0.60 | <b>Monômero</b>  | Karasawa <i>et al.</i> 2004      |
| <b>Kusabira Orange2</b> | 551 | 565 | 63.8  | 0.62 | <b>Monômero</b>  | Sakaue-Sawano <i>et al.</i> 2008 |
| <b>LSSmOrange</b>       | 437 | 572 | 52    | 0.45 |                  | Shcherbakova <i>et al.</i> 2012  |
| <b>PsmOrange</b>        | 548 | 565 | 113.3 | 0.51 |                  | Subach <i>et al.</i> 2011        |
| <b>PsmOrange2</b>       | 546 | 561 | 51    | 0.61 |                  | Subach <i>et al.</i> 2012        |
| <b>HcRed Tandem</b>     | 590 | 637 | 160   | 0.04 | <b>Monômero</b>  | Fradkov <i>et al.</i> 2002       |
| <b>Fusion Red</b>       | 580 | 608 | 95    | 0.19 |                  | Shemiakina <i>et al.</i> 2012    |
| <b>Katushka</b>         | 588 | 635 | 65    | 0.34 | <b>Dímero</b>    | Shcherbo <i>et al.</i> 2007      |
| <b>Katushka2</b>        | 588 | 633 | 69    | 0.37 | <b>Monômero</b>  | Shcherbo <i>et al.</i> 2009      |
| <b>AQ143</b>            | 595 | 655 | 90    | 0.04 | <b>Tetrâmero</b> | Shkrob <i>et al.</i> 2005        |
| <b>RFP611</b>           | 555 | 606 | 120   | 0.48 | <b>Monômero</b>  | Kredel <i>et al.</i> 2008        |
| <b>TdRFP611</b>         | 558 | 609 | 70    | 0.47 | <b>Monômero</b>  | Kredel <i>et al.</i> 2008        |
| <b>TDRFP639</b>         | 589 | 631 | 90.4  | 0.16 | <b>Monômero</b>  | Kredel <i>et al.</i> 2008        |

---

Ex: Excitação máxima; Em: Emissão máxima; EC: Coeficiente de extinção; QY: Rendimento quântico.

9.2 Certificado do protocolo de aprovação para o uso de peixes pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG).

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL  
Universidade Federal do Rio Grande  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP  
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br

CEUA

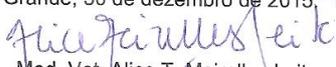


CERTIFICADO Nº P063/2015

Certificamos que o projeto intitulado "**Peixes transgênicos fluorescentes: um novo campo para a piscicultura ornamental no Brasil**", protocolo nº 23116.005268/2015-21, sob a responsabilidade de Daniela Volcan Almeida - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 18/11/2015 (Ata 015/2015).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

|                          |  |
|--------------------------|--|
| CEUA Nº                  | Pq024/2015                                 |
| VIGÊNCIA DO PROJETO      | 31/12/2017                                 |
| ESPÉCIE/ LINHAGEM        | <i>Danio rerio</i> / comercial             |
| NÚMERO DE ANIMAIS        | 1060                                       |
| PESO/ IDADE              | 600 – 1000 mg (adultos); 0,1 mg (embriões) |
| SEXO                     | 20 machos; 40 fêmeas; 1000 embriões        |
| ORIGEM                   | Biotério Aquático do ICB - FURG            |
| ENVIO DO RELATÓRIO FINAL | Janeiro de 2018                            |

Rio Grande, 30 de dezembro de 2015.  
  
Med. Vet. Alice T. Meirelles Leite  
Coordenadora da CEUA-FURG