



Desenvolvimento de métodos moleculares para identificação de peixes transgênicos

Cátia Alexandra Jesus Castro

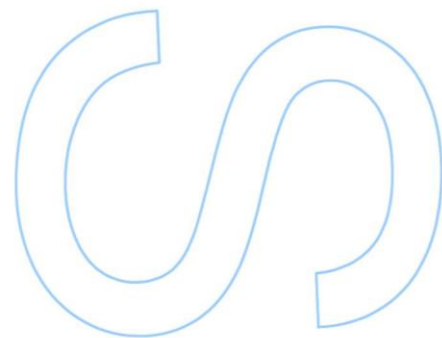
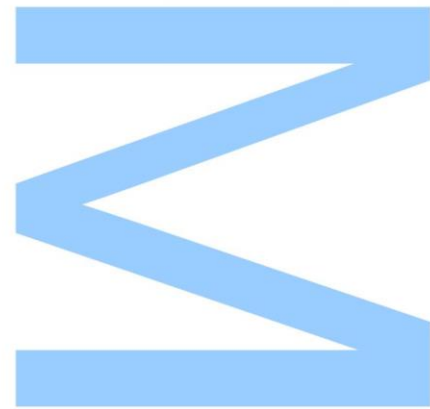
Mestrado em Genética Forense

Departamento Biologia

2015/2016

Orientador

Doutor Filipe Pereira, investigador, CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e ambiental



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

N

S

R

Agradecimentos

Ao meu orientador, Doutor Filipe Pereira, pelo apoio, paciência, experiência e ajuda ao longo deste ano de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório e de curso pela simpatia, espírito de equipa e entreatajuda e amizade.

Ao meu namorado, Ricardo Maia, pelas palavras de apoio, carinho e ajuda em alguns momentos de desânimo.

Aos meus irmãos, pela amizade e cumplicidade.

Aos meus pais, cujo o apoio e conselhos me incentivaram a concluir mais uma etapa da minha vida. Um obrigado pelo esforço que fazem todos os dias para me proporcionar uma vida repleta de amor, segurança, estabilidade, educação e bem-estar.

Dedicado aos meus pais

Resumo

O aumento da população mundial e o crescente consumo alimentar têm levado à saturação da produção de vários setores alimentares, incluindo a pesca. O desenvolvimento de peixes transgênicos ou geneticamente modificados (GM), obtidos pela inserção artificial do gene da hormona do crescimento, tem-se demonstrado eficazes na produção de peixes em cativeiro através da melhoria na eficiência da conversão alimentar e no aumento do crescimento somático. Recentemente, foi aprovado o primeiro animal geneticamente modificado (o salmão AquAdvantage) para consumo alimentar. Tendo em conta as preocupações dos consumidores quanto a este tipo de produtos e a rigorosa legislação implementada em diferentes países, é necessário desenvolver métodos de deteção de animais transgênicos que sejam capazes de assegurar as normas legais e o interesse dos consumidores. Neste trabalho desenvolvemos um kit molecular baseado na reação em cadeia de polimerase (PCR) para deteção simultânea dos diferentes elementos transgênicos (ex. promotores e genes da região de codificação) que, nos últimos anos, têm sido utilizados para produzir peixes geneticamente modificados incluindo, a carpa comum (*Cyprinus carpio*), tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), entre outros. Os *primers* de PCR foram desenhados para amplificar o gene da hormona do crescimento e três promotores, de modo a que cada elemento origine produtos amplificados de diferente tamanho. Todas as regiões alvo foram inicialmente testadas em PCR singleplex e posteriormente em PCR multiplex, sendo os produtos amplificados detetados por eletroforese em gel convencional e capilar. Em paralelo, desenvolvemos um método para detetar o *construct* utilizado no salmão Aquadvantage. Para tal, construímos uma molécula de DNA que inclui a junção entre os elementos utilizados no *construct* inserido no salmão transgênico. A junção foi obtida utilizando um *primer* localizado no promotor proteína anticongelante (AFP) com uma cauda com parte da sequência gene da hormona do crescimento, que fosse capaz de originar um único fragmento contendo as duas sequências. Posteriormente, testamos vários *primers* capazes de amplificar o *construct* utilizado no salmão Aquadvantage. Esta abordagem poderá ser utilizada noutros transgênicos, com a vantagem de não necessitar de uma amostra do organismo transgênico, apenas o conhecimento prévio da sequência inserida.

Palavras-chave: peixes transgênicos, organismos geneticamente modificados, PCR, salmão aquAdvantage

Abstract

The increase in world population and food consumption have led to a saturation in several food sectors, including fishing. The development of genetically modified (GM) fishes obtained through artificial insemination of the growth hormone gene improved feed conversion efficiency and increased body growth. Recently, the first GM animal has been approved for human consumption (AquAdvantage salmon). Considering the consumers concerns regarding this type of product and rigorous legislation implemented in several countries, it is necessary to develop methods for detecting GM animals capable of guarantee the statutory standards and the consumers interests. We have developed a molecular kit based on PCR for the simultaneous detection of the different transgenic elements (ex. promoters and coding regions) used to produce GM fish, such as the Common carp (*Cyprinus carpio*), the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). PCR primers were designed to amplify the growth hormone gene of seven species and three promoters so each element yields amplified products of different sizes. Each target region was initially tested in singleplex PCR, followed by multiplex PCR, and the amplified products were successfully detected through conventional and capillary gel electrophoresis. Additionally, we developed a method to detect the *construct* used in the AquAdvantage salmon. We generate a DNA molecule with the junction between the elements used in the *construct*. The junction was obtained using a primer located in the antifreeze protein promoter (AFP) with a tail including a section of the growth hormone gene, yielding a single fragment containing both regions. Finally, we designed primers able to amplify the obtained product, allowing to detect the *construct* used in the AquAdvantage salmon. Overall, we provide a straightforward way to detect the AquAdvantage salmon by using a strategy that can be adapted to any GM animal to be placed on the market in the future.

Key-words: transgenic fish, genetically modified organisms, PCR, aquAdvantage salmon

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Organismos transgênicos	1
Peixes transgênicos	1
Outras aplicações biotecnológicas	4
Elementos transgênicos	4
Promotores	4
Genes utilizados em transgênicos - o exemplo da hormona do crescimento	6
Salmão AquAdvantage	8
Meios de identificação de elementos transgênicos	9
Objetivos	13
Material e métodos	14
Seleção dos elementos transgênicos	14
Desenho do PCR multiplex	15
Amplificação singleplex e PCR multiplex	19
Separação electroforética e sequenciação	19
Deteção da sequência transgênica inserida no salmão AquAdvantage	20
Resultados e discussão	21
PCR singleplex e multiplex	21
Deteção da sequência transgênica inserida no salmão AquAdvantage	30
Conclusão	34
Bibliografia	37

Lista de figuras

Figura 1: Modelo geral de um *construct* usado para produzir animais geneticamente modificados.

Figura 2: *Construct* utilizado pela AquaBounty Technologies para produzir o salmão transgênico

Figura 3: Versão simplificada do esquema de decisões a tomar numa típica análise a amostras contendo organismos geneticamente modificados.

Figura 4: Alinhamento das sequências do gene da hormona do crescimento a partir de três espécies de salmonídeos

Figura 5: Alinhamento das sequências do gene da hormona do crescimento a partir de três espécies de ciprinídeos

Figura 6: Sequência transgênica utilizada para produzir o salmão AqAdvantage juntamente com os *primers* concebidos para a sua amplificação por PCR

Figura 7: Alinhamento das sequências entre a carpa comum e do salmão do Atlântico do exão 2 da hormona do crescimento.

Figura 8: Alinhamento de sequências do exão 4 da hormona do crescimento para a ligação do *primer Forward* utilizado no nosso ensaio. O *primer* da tilápia do nilo tem duas diferenças de nucleótidos nas últimas 5 posições na extremidade 3', quando comparado com as restantes espécies

Figura 9. Teste de PCR singleplex dos pares de *primers* concebidos para inclusão no PCR multiplex para deteção de peixes GM. As regiões-alvo e uma mistura de produtos amplificados ("mix singleplex") foram separadas em gel de agarose a 2%. Utilizou-se uma ladder de 100pb.

Figura 10. Teste de PCR singleplex dos pares de *primers* concebidos para inclusão no PCR multiplex para deteção de peixes GM. As regiões-alvo e a mistura de produtos amplificados ("mix singleplex") foram separados em eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel). O pico à esquerda representa o controlo interno de 15 pb.

Figura 11: Teste PCR singleplex dos pares de *primers* desenvolvidos para multiplex e deteção do promotor AFP em duas amostras (GMF 12 e 13) em gel de agarose a 2% e uma temperatura de *annealing* de 58°C. A- Amostra GMF12, B-Amostra GMF13 e C- controlo negativo.

Figura 12: Teste de especificidade para o par de *primers* concebido para inclusão no PCR multiplex e deteção do promotor β -actina da Carpa comum. Realizado a uma temperatura de 58°C.

Figura 13: Teste de PCR singleplex dos *primers* do promotor β -actina da Carpa comum desenvolvidos para serem incluídos no PCR multiplex, a uma temperatura de *annealing* de 58°C. GMF6- Carpa comum; GMF 11- Carpa capim; CN- controlo negativo

Figura 14: PCR singleplex para a deteção de peixes GM testados sobre um gradiente de temperaturas de *annealing* num gel de agarose a 2%. Utilizou-se uma ladder de DNA de 100 pb.

Figura 15: Teste de especificidade para os pares de *primers*, a uma temperatura de *annealing* de 62°C, concebidos para inclusão no PCR multiplex para deteção de peixes GM. A- promotor β -actina Carpa comum; B- promotor β -actina Carpa capim; C- GH salmonídeos; D- GH ciprinídeos; E- promotor AFP Ocean pout e F- GH tilápia do nilo.

Figura 16: Alinhamento da hormona do crescimento no exão 3 (A), exão 4 (B) e promotor da β – actina da Carpa capim (C). As setas a verde indicam a localização dos *primers* de PCR.

Figura 17: Alinhamento da sequência do promotor da β – actina da Carpa comum no local de encaixe do *primer Reverse* com a sequência da β – actina da Tilápia do nilo

Figura 18: PCR multiplex para a deteção de peixes GM testados a 62°C sobre um gel de agarose a 2%. Utilizou-se uma ladder de DNA de 100pb.

Figura 19: PCR multiplex para a deteção de peixes GM a uma temperatura de *annealing* de 62°C para o método de deteção em eletroforese capilar (sistema QIAxcel).

Figura 20: PCR singleplex para amplificação do *primer* cauda testado a diferentes gradientes de temperatura de *annealing*

Figura 21: PCR singleplex dos *primers* concebidos para amplificar a sequência transgênica que pensamos ser a utilizada no salmão AquAdvantage, a uma temperatura de 57°C.

Lista de tabelas

Tabela 1: Espécies de peixes transgênicos desenvolvidas nos últimos anos com potencial económico.

Tabela 2: Exemplo de promotores utilizados para produzir peixes transgênicos

Tabela 3: Exemplo de *constructs* contendo a hormona do crescimento com diferentes promotores em espécies de peixes transgênicos importantes para aquicultura

Tabela 4: Peixes transgênicos com *constructs* “all-fish”

Tabela 5: Elementos transgênicos e respetivos números de acesso

Tabela 6: Comprimento previsto das regiões amplificadas previstas no PCR multiplex para deteção de peixes transgênicos

Tabela 7: Lista de *primers* de PCR utilizados no ensaio PCR multiplex para a deteção de elementos transgênicos utilizados em peixes transgênicos

Tabela 8: Amostras usadas neste trabalho

Tabela 9: *Primers* desenvolvidos para amplificação do *construct* inserido no salmão transgênico

Tabela 10: Espécies testadas para os grupos dos salmonídeos e ciprinídeos

Lista de abreviaturas

OGM – organismos geneticamente modificados
GM- geneticamente modificados
DNA- ácido desoxirribonucleico
FDA - Food and Drugs Administration
cDNA- DNA complementar
EUA - Estados Unidos América
RSV - Vírus sarcoma Rous
Kb- quilo pares de bases
GH - Hormona do crescimento
GHR - Recetor da hormona do crescimento
IGF - Fatores de crescimento semelhantes à insulina
SNC - sistema nervoso central
AFP - Proteína anticongelante
AFGPs - Glicoproteína anticongelante
Mts – Metalotioneínas
SDS- Dodecil sulfato de sódio
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática
HPLC- cromatografia líquida de alta pressão
Electroforese 2D – eletroforese bidimensional
IHQ – exame imuno- histoquímico
PCR - Reação em cadeia de polimerase
qPCR- PCR em tempo real
UE - União europeia
COI - Citocromo oxidase I
BOLD - Barcode of Life Data System
BLAST- Basic Local Alignment Search Tool
WGS- Whole Genome Shotgun
MtDNA- DNA mitocondrial

Organismos transgênicos

Organismos transgênicos ou geneticamente modificados (OGM) são organismos que possuem cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA) introduzidas artificialmente no seu genoma [1]. A maioria dos produtos geneticamente modificados (GM) e comercializados a nível mundial são plantas. Neste caso, as sequências transgênicas são normalmente introduzidas por um vetor bacteriano (*Agrobacterium tumefaciens*) num local específico do genoma [2]. Em 1994 foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) a primeira planta geneticamente modificada para comercialização, o transgênico “*flavr savr tomato*” que consistia no retardar da maturação do tomate após colheita [3, 4]. A partir desta data, uma série de outras culturas transgênicas foram aprovadas, tais como, canola, milho, algodão, batata, soja, beringela, morangos, tomate, alface, melão, cenoura, beterraba, entre outros [3, 5]. Os genes inseridos conferem características que, do ponto de vista agronómico, são relevantes tais como, tolerância/resistência a herbicidas, melhorias no fornecimento de nutrientes e proteção contra insetos [2, 4]. Estes estudos de engenharia genética abriram uma série de novas oportunidades para aumentar a eficiência de produção e a qualidade nutricional de alimentos, não só em plantas como em alimentos de origem animal.

No que diz respeito aos animais transgênicos, a área aquícola é das mais relevantes devido à necessidade de aumentar o seu volume de produção num curto espaço de tempo e assim assegurar a crescente procura por produtos do mar [6]. Nos animais, a sequência transgênica é introduzida no pronúcleo de ovos fertilizados ou embriões *in vitro* que posteriormente são replantados no útero [7]. São transferidas várias cópias do mesmo transgene e, ao contrário do que é verificado nas plantas, são integrados aleatoriamente no genoma do hospedeiro [7].

Peixes transgênicos

O objetivo do desenvolvimento de peixes transgênicos é aumentar a produção de peixes economicamente importantes para o consumo humano. Nos últimos anos, a captura comercial de peixes sofreu uma forte redução e em contrapartida a procura mundial de peixe e dos seus produtos tem crescido exponencialmente. A fim de lidar com o aumento da procura por produtos do mar, muitos países viram na aquicultura uma solução. Embora a aquicultura tenha capacidade para enfrentar o aumento da procura por produtos de pesca, não é suficiente para assegurar o exigente e crescente consumo. Desta forma, são necessárias estratégias inovadoras para melhorar a eficiência da

produção de produtos alimentares [8]. A tecnologia dos transgênicos tem potencial para melhorar a produção de peixes em cativeiro por encurtamento do tempo de produção, reforçando a eficiência de produção devido a melhoria na conversão alimentar, minimizando custos e reduzindo as doenças a que estes animais ficam sujeitos em confinamento [9, 10].

Apesar das vantagens associadas aos organismos transgênicos, a incorporação destes na cadeia alimentar foi recebida com enormes críticas nos diversos sectores (alimentar, saúde e ambiental) pois a produção em laboratório de animais com alterações genéticas é ainda considerada perigosa [9]. Preocupações ecológicas surgem da probabilidade de fuga dos organismos geneticamente modificados para a vida selvagem. A consequente interação levaria à perturbação da biodiversidade natural de um ambiente [11]. Por outro lado, muito pouco se sabe sobre os efeitos nocivos do consumo, a longo prazo, de alimentos geneticamente modificados na saúde humana [12]. As preocupações dizem respeito à introdução ou aumento de alergenicidade e toxicidade de determinado alimento que anteriormente não era verificado [11, 13, 14]. Outra potencial área de preocupação é o aumento da resistência a doenças. Os peixes resistentes podem levar ao desenvolvimento de novos agentes patogênicos ou à ativação de sequências virais que, em seguida, poderiam ser transmitidas aos seres humanos através do seu consumo [9].

As principais características de crescimento dos peixes a serem melhoradas em aquicultura incluem o aumento da taxa de crescimento inicial de alevinos e em adultos e o melhoramento da eficiência de conversão alimentar para obter uma utilização eficaz dos alimentos [15]. Assim, a maioria dos estudos de peixes transgênicos é dirigida para a promoção do crescimento, destacando-se o uso do gene da hormona do crescimento (da sigla inglesa, GH). As primeiras experiências juntaram o gene da hormona do crescimento de mamíferos e promotores virais ou de mamíferos, tais como o vírus do sarcoma de Rous (RSV) e metalotioneína do rato [16, 17]. Na década de 90, a informação sobre as sequências de genes de peixes expandiu rapidamente devido ao desenvolvimento de muitas tecnologias no ramo da biologia molecular e bioinformática [18]. Desta forma, a investigação focou-se no uso de *constructs* com a hormona do crescimento derivada de peixes [19]. O primeiro caso de sucesso de peixes transgênicos ocorreu em 1985, quando um grupo de investigadores microinjectaram o gene da hormona do crescimento humano com o promotor metalotioneína do rato em ovos de peixe-dourado (*Carassius auratus*) [20]. O primeiro peixe transgênico comercialmente importante foi produzido em 1988, a tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), usando o mesmo *construct*. Desde essa altura, vários transgênicos foram desenvolvidos em espécies comercialmente importantes (Tabela 1) [9, 21, 22].

Tabela 1: Espécies de peixes transgênicos desenvolvidas nos últimos anos com potencial económico.

Espécies	País	Promotor	Espécie de origem da hormona do crescimento
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Israel	β -actina da carpa	Salmão rei
		β -actina da carpa	Carpa comum
	Canadá	AFP do <i>Ocean pout</i>	Salmão rei
	China	β -actina da carpa comum	Carpa capim
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>) do rio amarelo	China	Desconhecido	Carpa capim
Salmão rei (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	Canadá e Nova Zelândia	AFP do <i>Ocean pout</i>	Salmão rei
Salmão prateado (<i>Oncorhynchus Kísutch</i>)	Canadá	AFP do <i>Ocean pout</i>	Salmão rei
Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>)	Canadá	AFP do <i>Ocean pout</i>	Salmão rei
Truta salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii</i>)	Canadá	AFP do <i>Ocean pout</i>	Salmão rei
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>)	Canadá	AFP do <i>Ocean pout</i>	Salmão rei
	Finlândia	Desconhecido	Salmão vermelho
Wami tilápia ou tilápia de zanzibar (<i>Oreochromis urolepis hornorum</i>)	Cuba	Citomegalovírus (CMV)	Tilápia
Tilápia do nilo (<i>Oreochromis Niloticus</i>)	Alemanha	Metalotioneína I do rato	Humana
	Inglaterra	AFP do <i>Ocean pout</i>	Salmão rei
Goraz (Silver sea bream)	Taiwan/EUA	β -actina da carpa	Truta arco iris
Truta do ártico (<i>Salvelinus Alpinus</i>)	Finlândia		Salmão vermelho e Atlântico
Lúcio (<i>Esox Lucius</i>)	USA/ Israel/Espanha	β -actina da carpa	Salmão vermelho
Ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>)	Taiwan	β -actina da carpa	Truta arco iris
Mud Loach (<i>Misgurnus Mizolepis</i>)	Coreia do Sul	β -actina do <i>Mud loach</i>	<i>Mud loach</i>
Abalone (<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>)	Taiwan	AFP Ocean pout	Salmão rei

Os peixes transgênicos podem ser classificados em duas categorias consoante o tipo de *construct* que é transferido: autotransgênico e alotransgênico.

Autotransgênico define um organismo transgênico em que todos os elementos genéticos que compõem o *construct* são derivados da mesma espécie que o hospedeiro [23]. Alguns exemplos de peixes transgênicos desta categoria são o *Mud Loach* (*mizolepis Misgurnus*), a tilápia do nilo (*Oreochromis Niloticus*) [18] e os transgênicos da carpa comum (*Cyprinus carpio*) em que o seu *construct* contém um promotor da β - actina isolado a partir do seu próprio genoma e um gene da hormona do crescimento a partir de uma espécie relacionada, a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*).

Alotransgênico define um organismo transgênico em que os elementos genéticos do *construct* derivam de espécies diferentes [18, 23]. Os peixes alotransgênicos podem ser subdivididos em três classes cujas categorias são:

- Tanto o promotor como o gene estrutural provêm de espécies de peixes relativamente distantes do ponto de vista genético [23];
- O promotor deriva de espécies de peixes filogeneticamente distantes e o gene estrutural de espécies filogeneticamente próximas. Um exemplo desta categoria é o salmão do Atlântico transgênico (salmão AquAdvantage) [23];

- Tanto o promotor como o gene estrutural originam de espécies de peixes relacionados geneticamente. A taxa de crescimento observada nos peixes modificados com o *construct* desenvolvido nesta categoria foi superior às restantes. Desta forma, é de destacar a importância da homologia entre os diferentes elementos que constituem o *construct*. Este tipo difere dos autotransgênicos uma vez que todos os componentes não são da mesma origem que o hospedeiro [23].

Outras aplicações biotecnológicas

Para além do crescimento dos organismos, a tecnologia transgênica em peixes tem sido direcionada para inúmeras outras aplicações biotecnológicas. Alguns exemplos são aumento da resistência a doenças pela introdução de genes específicos responsáveis pela defesa imunitária, biomonitores ambientais através da observação da alteração da cor corporal e controlo dos tecidos dos peixes, alteração do metabolismo de peixes criados em aquicultura de forma a torna-los aptos a alimentos derivados de plantas, indução da esterilidade em peixes transgênicos como um meio de confinamento biológico, aumento da tolerância à salinidade, aumento da resistência e tolerância ao frio e como modelos para o desenvolvimento e produção de proteínas terapêuticas para utilização médica e farmacêutica [15, 18]. O uso de peixes transgênicos como modelo animal para investigação biomédica tem diversas vantagens, algumas delas são o facto de gerarem descendência num curto espaço de tempo e em grande número, de baixo custo e baixo risco de transmissão de patogénicos para mamíferos [24].

Elementos transgênicos

O DNA inserido no genoma do hospedeiro (*construct*) normalmente inclui um promotor que regula a expressão do gene, um gene estrutural (cDNA) que codifica para uma alteração específica e um terminador que funciona como um sinal de interrupção de leitura do gene inserido (Figura 1) [4, 18, 25].

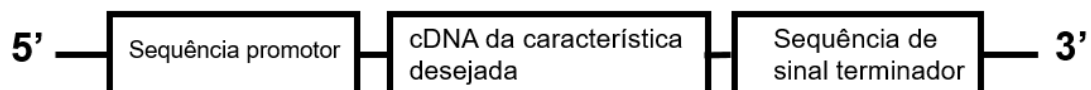


Figura 1: Modelo geral de um *construct* usado para produzir animais geneticamente modificados.

Promotores

A escolha de um promotor adequado irá ajudar a assegurar que o gene alvo é expresso no local correto (células, tecidos e órgãos), no momento correto (estágios de

desenvolvimento), no nível fisiológico apropriado e sob uma condição particular (isto é, na presença ou ausência fatores ambientais) [18]. Os promotores podem ser de dois tipos: constitutivos, a jusante do gene e são expressos em todos os momentos [18], e indutíveis, ativam o gene apenas sob condições específicas (por exemplo, determinadas temperaturas, ou presença de produtos químicos e hormonas específicas) [18].

A correta escolha do promotor contribui para a obtenção de elevados níveis de expressão do gene, como no caso da hormona do crescimento. Os primeiros promotores utilizados eram virais ou de mamíferos [15], sendo substituídos por promotores derivados de peixes concebendo-se uma nova criação de *constructs* denominados de “all-fish” [17, 26]. Este novo conceito foi utilizado em várias espécies de peixes, incluindo a carpa comum (*Cyprinus carpio*) [27], goraz (*Sparus Sarba* e *Pagrosomus major*) [28], tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) [29] e todas as espécies de Salmonídeos [9, 16]. Este modelo tem como objetivo promover a sua aceitação por parte da comunidade científica e consumidores, diminuir os problemas com a segurança alimentar e aumentar a possibilidade de entrada no mercado. Além disso, os *construct* “all-fish” são expressos de forma mais eficiente do que os *construct* com elementos virais ou de mamíferos [19]. Na tabela 2 encontra-se alguns dos promotores mais utilizados em peixes transgênicos [15]

Tabela 2: Exemplo de promotores utilizados para produzir peixes transgênicos

	Espécies	Promotor
Derivado de outras espécies	Rato	GAP43
		Metalotioneína
	Galinha	β -actina
	Xenopus	Fator 1- α
	Citomegalovírus	CMV
	Vírus da leucemia dos ratos	MoMLV LTR
	Vírus da Leucemia	
Derivado de espécies de peixes	Carpas	β -actina
	Peixe-dourado	α -tubulina 1
	Medaka japonês	Fator 1 α e β -actina
	Peixe-zebra	α -actina, proteína de choque térmico 70 (HSP-70)
	<i>Ocean pout</i>	AFP
	Ciprinídeos	β -actina

Um dos promotores mais utilizados deriva do gene codificante da proteína anticongelante (AFP). As glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) são proteínas plasmáticas sintetizadas principalmente no fígado e excretadas para a corrente sanguínea para serem distribuídas por todo o espaço extracelular e intersticial inibindo a formação de

cristais de gelo na superfície corporal dos peixes por diminuição do ponto de congelação dos fluidos corporais [30, 31]. As concentrações de AFGPs no plasma sanguíneo mostram ser sazonais e geograficamente distintas. Os fatores que influenciam são o fotoperíodo, a hormona do crescimento, o fator de crescimento semelhante à insulina e embora não tenha um papel importante na iniciação da produção nem esteja envolvida na terminação da produção, é importante que a temperatura da água seja suficientemente baixa (<8°C) para que a sua síntese se inicie. O *Ocean Pout* (*Macrozoarces americanus*) parece ser a única espécie a produzir altas concentrações de AFP durante todo ano [30].

O sistema nervoso central (SNC) normalmente controla os níveis de excreção da hormona do crescimento, que são altamente variáveis e sazonais nos Salmonídeos. A proteína anticongelante (AFP) do *Ocean pout* é expressa durante todo o ano no fígado. Como forma de contornar o controlo do SNC sobre a expressão da hormona do crescimento, a pesquisa dos transgênicos envolve a junção do gene da hormona do crescimento ao promotor do gene AFP [9].

A β -actina é outro promotor bastante utilizado em peixes transgênicos. As actinas do tipo muscular são específicas dos tecidos e estão envolvidas na contração muscular [32]. As actinas citoplasmáticas são expressas em todo o tipo de células e participam numa variedade de funções celulares [32]. A α – actina do músculo-esquelético desempenha um papel chave no movimento muscular e é a principal proteína dos músculos juntamente com a miosina [33]. A β -actina pode ser usada na geração de animais transgênicos pela sua expressão ubíqua em todas as células e tecidos [34, 35]. O promotor β – actina do rato foi o primeiro a ser utilizado com sucesso em *constructs*. Mais recentemente, a caracterização desta sequência em peixes permitiu a produção de *constructs* “all-fish” [36]. Entre os peixes comercialmente importantes alterados com o *construct* contendo o promotor da β – actina encontra-se a carpa Rohu [37], a carpa comum e a carpa capim [38, 39].

Genes utilizados em transgênicos - o exemplo da hormona do crescimento

A hormona do crescimento é um polipéptido de cadeia simples com cerca de 22 kb excretada pela glândula pituitária, sob controlo do SNC [40]. Esta hormona liga-se a recetores específicos das células, o recetor GH (GHR) [41] induzindo a síntese e secreção de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e IGF-II), resultando na promoção do crescimento somático através da melhoria do apetite e eficiência da conversão alimentar [9]. Nos peixes, a hormona do crescimento participa em quase todos os principais processos fisiológicos do corpo, incluindo a regulação do equilíbrio iónico e osmótico, metabolismo dos lipídios, proteínas e de hidratos de carbono, no crescimento dos tecidos, aumento do número e tamanho das células, reprodução e maturação sexual

e função imunológica. Estudos recentes indicam que a hormona do crescimento afeta vários aspetos do comportamento, incluindo, comportamento predatório e agressividade, que por sua vez tem consequências ecológicas [41, 42].

Apesar do vasto conhecimento sobre a ação da hormona do crescimento em peixes, o seu modo de atuação ainda não está esclarecido. Julga-se que todos os efeitos provocados pela hormona do crescimento sejam indiretos, afetando o crescimento, metabolismo, desenvolvimento, reprodução e regulação osmótica da água do mar [41].

O fotoperíodo parece ser o fator mais influente na maturação dos peixes em diferentes partes do seu ciclo de vida. A temperatura da água também desempenha um papel importante na modulação dos níveis da hormona do crescimento. Embora este fator tenha sido estudado em menor extensão, salmões em temperaturas mais elevadas parecem ter níveis superiores de hormona do crescimento quando comparados com salmões em água fria [42].

Na maioria das espécies de peixes que possuem o transgene com a hormona do crescimento observou-se um aumento da sua taxa de crescimento. O peixe atinge, aproximadamente, o dobro do tamanho normal do corpo em metade do tempo normal de crescimento. Os efeitos das taxas de crescimento foram obtidos para algumas espécies de Salmonídeos, de entre os quais o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), o salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) e truta do ártico (*Salvelinus alpinus*). No entanto, os níveis de crescimento foram variáveis entre as diferentes linhas de transgênicos. Estudos revelaram que o crescimento pode depender da taxa de crescimento intrínseca e características genéticas da espécie hospedeira [16]. Na tabela 3 encontram-se alguns exemplos de *constructs* da hormona do crescimento com diferentes promotores em espécies de peixes transgênicos importantes para aquicultura [16, 17].

Tabela 3: Exemplo de *constructs* contendo a hormona do crescimento com diferentes promotores em espécies de peixes transgênicos importantes para aquicultura.

Espécies	Promotor	Origem da hormona do crescimento	Construct
Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>)	AFP <i>Ocean pout</i>	Salmão rei	OPAFPCsGH
Salmão prateado (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	MT Salmão vermelho	Salmão vermelho	OnMTGH1
	AFP <i>Ocean pout</i>	Salmão rei (cDNA)	OPAFPCsGH
Tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	AFP <i>Ocean pout</i>	Salmão rei	OPAFPCsGH
Tilápia do nilo (<i>O. niloticus</i>)	MT Salmão vermelho	Salmão vermelho	OnMTGH1
Wami tilápia ou tilápia de zanzibar (<i>Oreochromis hornorum</i>)	Citomegalovírus humano	Tilápia (cDNA)	CMVtiGH
Truta do ártico (<i>salvelinus alpinus</i> L.)	Citomegalovírus humano	Salmão vermelho	CMVGH1
	MT Salmão vermelho		(ONMTGH1)
	H3 Salmão vermelho		(ONH3GH1)
Truta arco-íris (<i>oncorhynchus mykiss</i>)	Homólogo	Salmão Atlântico	SsGH2
<i>Mud loach</i> (<i>misgurnus mizolepis</i>)	β -actina <i>Mud Loach</i>	Homólogo	pm β actGH

Salmão AquAdvantage

Em novembro de 2015, a FDA aprovou o primeiro animal transgênico para comercialização, o salmão AquAdvantage criado pela AquaBounty Technologies. É o primeiro animal geneticamente modificado aprovado para consumo humano e foi desenvolvido em 1989 [43]. O AquAdvantage é um salmão do Atlântico (*Salmo salar*) produzido pela introdução do *construct* com DNA “all-fish” contendo o promotor AFP do *Ocean pout* (*Zoarces americanus*) com o gene da hormona do crescimento do salmão rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Figura 2) [26]. Este animal transgênico foi projetado para atingir o tamanho de mercado cerca de duas vezes mais rápido que a espécie nativa, sendo o crescimento acelerado concentrado no seu primeiro ano de vida [44].

Salmão AquAdvantage®

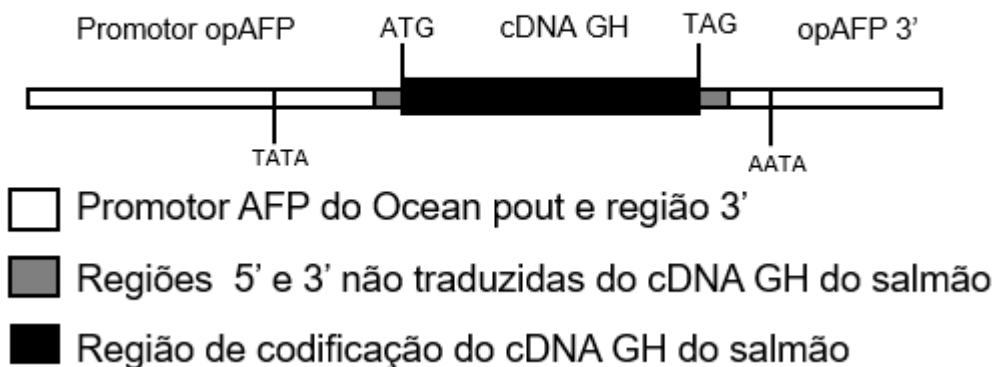


Figura 2: *Construct* utilizado pela AquaBounty Technologies para produzir o salmão transgênico.

O processo de aprovação do salmão AquAdvantage levado a cabo pela FDA incidiu sobre a avaliação dos potenciais riscos para a saúde humana e meio ambiente. Apesar da aprovação dada pela FDA continuam a surgir perceções negativas quanto a estas duas premissas [45].

Meios de identificação de elementos transgênicos

Ao longo dos anos têm sido comercializados um crescente número de organismos geneticamente modificados a nível mundial. A União Europeia tem implementado um conjunto de procedimentos rigorosos para a aprovação, importação e/ou utilização de organismos geneticamente modificados como alimentos. O processo legislativo da UE garante o direito à informação dos consumidores europeus [46, 47]. Uma das normas mais importantes implementadas na União Europeia acerca deste tema recai sobre o regulamento (CE) nº 1830/2003, que introduziu os conceitos relativos à rastreabilidade e rotulagem em alimentos para consumo humano e alimentos para animais produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. Este regulamento estabelece regras para assegurar que os produtos que contêm organismos geneticamente modificados e os géneros alimentícios e alimentos para animais derivados de organismos geneticamente modificados possam ser rastreados em todas as fases da cadeia de produção e distribuição [2]. É importante notar três novos requisitos de rotulagem de organismos geneticamente modificados na UE a partir de 2003: 1) a obrigatoriedade de rotulagem para todos os alimentos geneticamente modificados independentemente da detetabilidade de DNA ou proteína resultante da modificação no produto final, 2) as mesmas regras de rotulagem também se aplicam para a alimentação animal e 3) a implementação de um limiar de tolerância de 0,9% para a presença de organismos geneticamente modificados aprovados nos alimentos. Para alimentos que contenham presença acidental de organismos geneticamente modificados não é verificado um limiar de tolerância [2]. O objetivo do regulamento é “proteger o meio ambiente, bem-estar humano e animal e assegurar a escolha do consumidor” [48].

De forma a executar estas normas de rotulagem, é essencial desenvolver e padronizar métodos analíticos rápidos e precisos capazes de monitorizar o conteúdo de organismos geneticamente modificados em produtos alimentares para animais [49]. Os ensaios utilizados para a deteção de organismos geneticamente modificados podem ser agrupados em 3 categorias dependendo da especificidade do método [50]:

- Métodos de rastreio: identificam as sequências de DNA que são frequentemente inseridas nos organismos geneticamente modificados (ex.

promotores, sequências de genes que codificam para a característica desejada, terminadores). Permitem a detecção de uma ampla variedade de organismos geneticamente modificados, mas não permitem identificar com certeza qual o *construct* presente na amostra. Resultados positivos em testes de rastreio não implicam necessariamente a presença de DNA derivado de organismos geneticamente modificados pois estes elementos podem ocorrer naturalmente no organismo hospedeiro;

➤ Métodos específicos do *construct*. concebidos para identificar a junção entre os diferentes elementos transgênicos que constituem o *construct* inserido. Estes métodos são mais informativos em termos de presença ou ausência de eventos específicos, mas não conseguem distinguir entre eventos diferentes que possam conter a mesma ou semelhante construção transgênica;

➤ Métodos específicos para a junção entre DNA transgene-DNA hospedeiro (ensaios de eventos específicos): estes métodos são altamente específicos pois têm de ser desenhados sobre a junção entre o DNA hospedeiro e as sequências transgênicas integradas. Por exemplo, um *primer* de PCR é específico para o *construct* e um outro *primer* específico para a sequência genómica flanqueadora e são geralmente aplicados em amostras positivas de rastreios. Estes métodos ainda não podem ser aplicados em animais geneticamente modificados uma vez que não é conhecido o local de inserção do *construct*.

Considerando a grande diversidade de diferentes elementos geneticamente modificados, a aplicação de métodos de rastreio é frequentemente o primeiro passo na análise de testes de rotina em amostras podendo-se aferir quanto à presença ou ausência de eventos transgênicos [51]. Estes testes devem abranger o maior número possível de eventos transgênicos para que posteriormente possam contribuir para reduzir o número de testes necessários nas etapas de identificação e consequente quantificação, reduzindo a carga de trabalho e o custo de análises nas etapas subsequentes [2]. No caso em que os resultados do rastreio forem negativos, a análise é concluída e nenhuma ação na amostra testada é necessária. Se o resultado do teste de rastreio for positivo, não é conhecido qual o *construct* presente na amostra, portanto, uma segunda etapa é necessária para identificar o evento transgênico específico na amostra [2]. Nos casos em que os testes de triagem forem positivos e os eventos específicos forem todos negativos, pode concluir-se que se esta na presença de organismos geneticamente modificados não aprovados [50]. Neste caso, um terceiro passo é realizado: quantificação do material de cada indivíduo geneticamente modificado detetado na amostra para definir se o seu conteúdo é acima ou abaixo do limiar de rotulagem definido na legislação (0,9 %). Se o

teor for superior ao limite, o produto tem de ser retirado do mercado e o mesmo acontece para amostras com a presença de organismos geneticamente modificados não autorizados [2] (Figura 3).

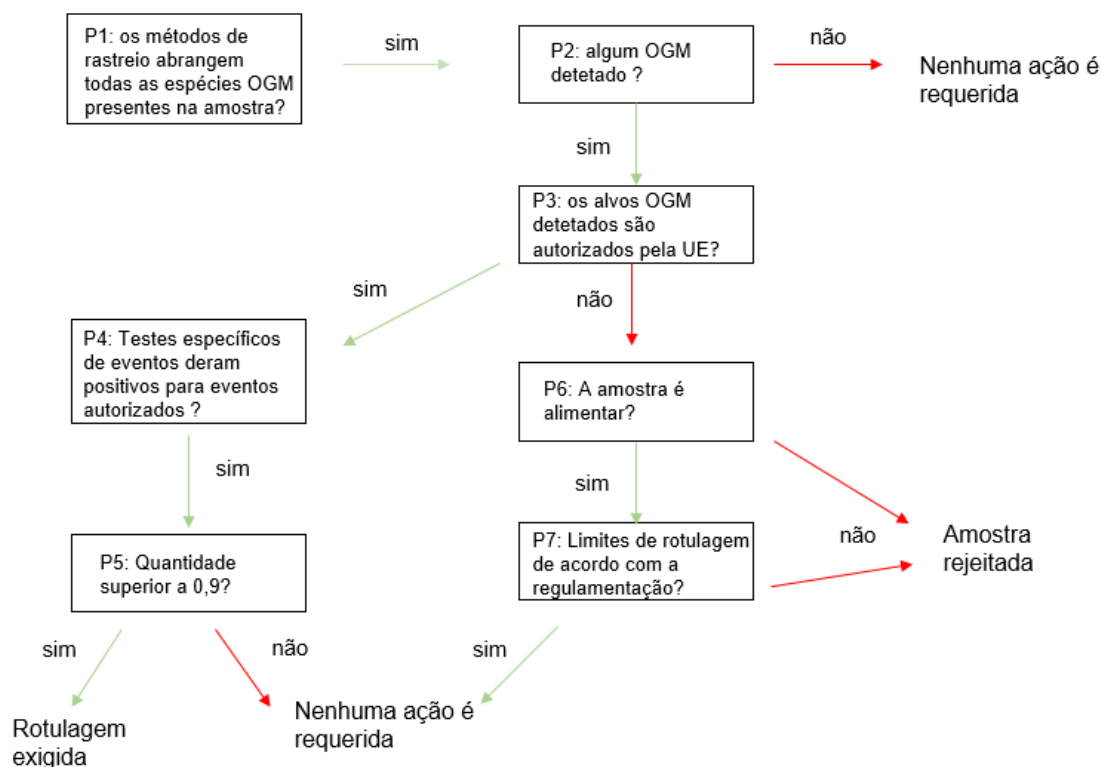


Figura 3: Versão simplificada do esquema de decisões a tomar numa típica análise a amostras contendo organismos geneticamente modificados.

A deteção de um organismo modificado ou um produto derivado de um organismo geneticamente modificado pode ser realizada usando duas principais metodologias: identificando os DNA/RNA integrado no genoma do hospedeiro ou através das proteínas expressas pelo transgene [49, 52].

A metodologia analítica baseada no DNA/RNA é mais comumente utilizada devido à sua elevada sensibilidade e principalmente pela estabilidade do DNA em comparação com as proteínas [49, 50]. As proteínas estão sujeitas a degradação durante os processos de transformação dos produtos alimentares (químicos, físicos, etc.) pelo que a sua deteção se torna mais complicada [52]. Os métodos utilizados são baseados na deteção imunológica das proteínas ou sobre a comparação de padrões de proteínas, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), *western blot*, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), eletroforese bidimensional (eletroforese 2-D) e imuno-histoquímica (IHQ). No entanto, o facto de muitas proteínas ficarem desnaturadas durante o processamento dos alimentos

e o facto de que a proteína introduzida pelo transgene já se encontrar no hospedeiro mas em menor concentração faz com que não seja possível distinguir com clareza os padrões proteicos derivados de um alimento não geneticamente modificado de um alimento geneticamente modificado [4]. Estas duas premissas conferem uma desvantagem das técnicas à base de proteínas quando comparadas com as técnicas de baseadas no DNA [53].

Diferentes métodos de deteção de organismos geneticamente modificados baseados no DNA estão descritos na literatura para deteção de plantas transgénicas [28, 54, 55]. Por exemplo, a presença de transgenes pode ser feita através do método de *Southern blot* [7, 56], que no entanto é dispendioso e pouco sensível [7, 36]. Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos métodos mais utilizados para a deteção de organismos geneticamente modificados [25, 57], sendo o método de eleição na UE para testar o cumprimento da rotulagem de alimentos [50]. Esta técnica tem a vantagem de detetar pequenas quantidades de transgene mesmo em alimentos processados [58], é um método rápido, sensível, específico e requer pequenas quantidades de amostra (<1ng), permite lidar com um grande número de amostras e é não invasivo [36, 46]. A técnica de PCR pode ser facilmente implementada em análises de rotina, abrangendo o maior número de eventos transgénicos possível de acordo com a triagem [59]. A deteção de organismos transgénicos por PCR requer o conhecimento prévio da sequência de DNA inserida para que posteriormente seja possível o desenho de *primers* específicos [60].

As abordagens mais recentes consistem na amplificação de plantas transgénicas em PCR multiplex [47]. A deteção em PCR singleplex é um processo demorado e caro devido à necessidade de realizar várias reações independentes [61]. O PCR multiplex é uma variante da PCR singleplex em que mais de uma sequência alvo pode ser amplificada. Tem o potencial para produzir considerável economia de tempo e esforço no laboratório, [57] além de poder ser desenhado de forma a amplificar fragmentos curtos o que confere uma vantagem na presença de alimentos processados [58].

Desde a primeira espécie transgénica aprovada para comercialização até aos dias de hoje, um crescente número de diferentes culturas geneticamente modificadas foram cultivadas à escala mundial e, conseqüentemente, várias foram as técnicas desenvolvidas para a deteção, quantificação e identificação de elementos transgénicos [62]. Ao contrário do que é verificado nas plantas, a diversidade de técnicas desenvolvidas para identificar animais transgénicos é limitada uma vez que só agora se iniciou a comercialização do primeiro animal geneticamente modificado. Contudo, alguns dos métodos empregues no domínio das plantas podem ser aplicados diretamente para os animais, embora nenhum método tenha sido validado [25]. Em relação aos peixes transgénicos, não existe nenhum método de deteção simultânea dos elementos transgénicos.

Objetivos

O primeiro objetivo deste trabalho é desenvolver um método para detetar em simultâneos os elementos transgénicos mais utilizados em peixes geneticamente modificados. Este método servirá como um teste de rastreio rápido pois irá incluir os elementos mais utilizados na construção de peixes transgénicos.

O segundo objetivo passa por desenvolver um método capaz de detetar a sequência transgénica inserida no salmão AquAdvantage. Este método tem como vantagem o facto de ser desenvolvido sem a necessidade de uma amostra de DNA referência.

Os dois principais objetivos desta tese incluem os seguintes objetivos intermédios:

- Identificar, recolher e alinhar as sequências dos elementos transgénicos mais utilizados em *constructs* “all-fish”;
- Desenhar *primers* de PCR para amplificar os elementos transgénicos e da junção utilizada no salmão AquAdvantage;
- Testar a eficiência dos *primers* nas amostras referência por PCR singleplex;
- Desenvolvimento de um PCR multiplex para deteção simultânea dos elementos transgénicos mais utilizados em peixes transgénicos;
- Construir a junção utilizada no salmão AquAdvantage para sua posterior deteção e identificação.

Material e métodos

Seleção dos elementos transgênicos

Começamos por identificar todos os peixes transgênicos com construções "all-fish" descritas na literatura científica [9, 16, 63] (Tabela 4). Foram excluídos os peixes com elementos transgênicos virais e de mamíferos uma vez que estes não são suscetíveis de serem comercializados. Também excluímos peixes transgênicos utilizando promotores da metalotioneína uma vez que precisam da presença de metais pesados para a sua regulação, tornando-os improváveis de virem a ser comercializados.

Os elementos transgênicos mais frequentemente utilizados em peixes são os promotores da β – actina [64] e AFP [65], uma vez que eles apresentam elevada expressão nos tecidos e são expressos ubiquamente. O gene mais utilizado em peixes transgênicos é a hormona do crescimento devido ao seu papel no crescimento dos tecidos (Tabela 4).

Tabela 4: Peixes transgênicos com *constructs* "all-fish"

Animal transgênico	Construct (espécies e gene)		Referências
	Promotor	Gene/região codificante (cDNA da hormona do crescimento)	
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	β -actina da carpa comum	GH da carpa capim	[66]
Salmão rei (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	AFP do <i>Ocean pout</i>	GH do salmão rei	[67]
Salmão prateado (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	AFP do <i>Ocean pout</i>	GH do salmão rei	[67]
Truta salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii</i>)	AFP do <i>Ocean pout</i>	GH salmão rei	[67]
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	AFP do <i>Ocean pout</i>	GH salmão rei	[67]
Tilápia do nilo (<i>Oreochromis niloticu</i>)	AFP do <i>Ocean pout</i>	GH salmão rei	[29]
Goraz (Silver sea bream)	β -actina da carpa comum	GH da truta arco-íris	[28]
Lúcio (<i>Esox lucius</i>)	β -actina da carpa	GH do salmão rei	[68]
Ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>)	β -actina da carpa	GH da truta arco-íris	[69]
Salmão Atlântico (<i>Salmo salar</i>)	AFP do <i>Ocean pout</i>	GH salmão rei	[70]
Carpa Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	β -actina da carpa capim	GH da carpa Rohu	[37]
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	β -actina da carpa comum	GH salmão rei	[38]

Esta informação permitiu-nos selecionar os elementos mais utilizados para a construção de peixes transgênicos (Tabela 5). As sequências dos elementos transgênicos foram recolhidas da base de dados *NCBI Entrez nucleotide* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através de pesquisa com o nome da espécie e o nome da região-alvo (por exemplo, *Cyprinus carpio* e *growth hormone*). Desta forma foi-nos possível encontrar as sequências genéticas para todos os alvos com exceção da hormona do crescimento da truta arco-íris (Tabela 5), para a qual foram encontrados apenas sequências de mRNA. Neste caso, tivemos que fazer uma pesquisa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) usando o gene da hormona do crescimento do salmão do Atlântico (que também é um salmonídeo) contra o *Whole genome shotgun* (WGS) da truta arco-íris. A sequência com o número de acesso CCAF010016392.1 foi alinhada com a sequência mRNA da hormona do crescimento da truta arco-íris (NM_001124689.1), a fim de identificar a localização precisa dos exões GH. O alinhamento das sequências foi realizado recorrendo à ferramenta Muscle [71] implementada no software v5.3 Geneious Pro (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelândia)

Tabela 5: Elementos transgênicos e respetivos números de acesso

	Elementos	Número de acesso
Gene da hormona do crescimento (GH)	GH Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	AY553379.1
	GH Carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	X60419.1
	GH Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	AF418921.1
	GH salmão atlântico (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	EU621901.1
	GH Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CCAF010016392.1
	GH salmão atlântico (<i>Salmo salar</i>)	AY614002.1
	GH Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	HM565014.1
Promotores	Promotor AFP Ocean pout (<i>Zoarces americanus</i>)	AY687640.1
	Promotor β -actina Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	HQ335170.1
	β -actina carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	M25013.1

Desenho do PCR multiplex

Decidimos desenhar um par de *primers* de PCR para o gene GH dos Salmonídeos (salmão do Atlântico, salmão rei e truta arco-íris) e outro par para Ciprinídeos (carpa comum e capim e carpa Rohu). Deste modo, fomos capazes de reduzir o número de regiões amplificadas no PCR multiplex final, permitindo a sua discriminação por eletroforese em gel de agarose convencional. Um único par de *primers* de PCR foi desenhado para o gene da hormona do crescimento da tilápia do nilo. Os *primers* de PCR foram concebidos dentro dos exões do gene da hormona do crescimento de modo a que igual produto amplificado fosse obtido na presença de DNA genómico ou de cDNA utilizados nos peixes transgênicos. As sequências do exão da hormona do crescimento

mais conservadas em Salmonídeos e Ciprinídeos foram selecionados por inspeção visual de dois alinhamentos, uma para cada família de peixes (Figs. 4 e 5). Este procedimento permitiu-nos identificar as regiões mais conservadas adequadas para a localização do *primer* de PCR capaz de amplificar todas as espécies. Para o desenho dos *primers* de PCR para deteção do promotor AFP do *Ocean pout*, utilizamos a sequência obtida a partir de um *construct* sintético (AY594644.1), onde este promotor está associado ao cDNA da hormona do crescimento do salmão rei. Este *construct* é utilizado na melhoria do crescimento do salmão do Atlântico transgênico.

Os *primers* para o promotor β – actina da carpa comum foram concebidos a partir de uma sequência extraída a partir de um vetor de clonagem com o número de acesso HQ335170.1. Desta forma, fomos capazes de identificar a região do promotor usando abordagens de clonagem molecular. Esta sequência promotora foi utilizada para definir a região de interesse no gene da β -actina *Carpa capim*, que não tinham uma anotação para o promotor. Também confirmamos que as regiões promotoras selecionadas tinham uma sequência CAAT, que é um padrão de nucleótidos distinto que ocorre a montante do local de transcrição inicial.

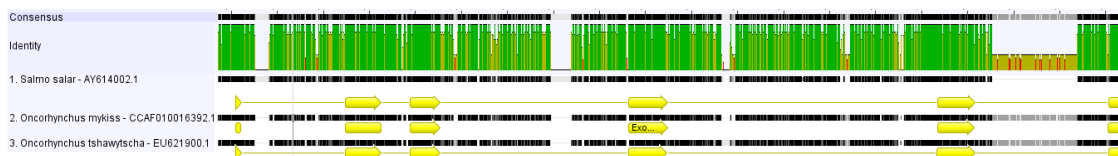


Figura 4: Alinhamento das sequências do gene da hormona do crescimento a partir de três espécies de salmonídeos

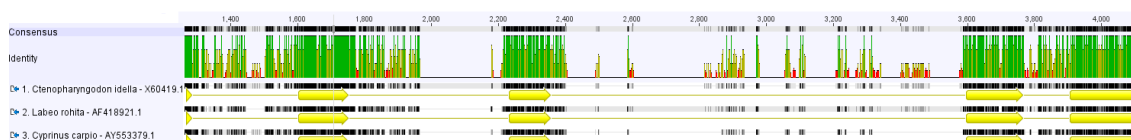


Figura 5: Alinhamento das sequências do gene da hormona do crescimento a partir de três espécies de ciprinídeos

As regiões a amplificar foram selecionados por forma a permitir diferenças de tamanho significativo numa separação electroforética. O PCR final origina amplicões com os tamanhos teóricos descritos na tabela 6.

Tabela 6: Comprimento previsto das regiões amplificadas previstas no PCR multiplex para detecção de peixes geneticamente modificados.

Alvo	Amplificação (pb)
Promotor AFP <i>Ocean pout</i>	269
Promotor β -actina <i>Carpa</i> comum	227
Promotor β -actina <i>Carpa</i> capim	181
GH tilápia do nilo	125
GH <i>Ciprinídeos</i>	100
GH <i>salmonídeos</i>	80

Vários critérios foram utilizados para desenhar os *primers* PCR que delimitam especificamente o exão ou promotor das regiões selecionadas:

1. Os *primers* foram desenhados para evitar posições variáveis nas últimas cinco posições da extremidade 3' por inspeção visual de alinhamentos;
2. Os *primers* foram desenhados com uma temperatura de *annealing* prevista entre os 57°C e 62°C, estimada no site OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>);
3. Os *primers* foram testados para evitar interações de dímeros e hairpins no site OligoCalc.

A seguinte nomenclatura foi implementada para designar o nome dos *primers*: primeira letra do gênero + três primeiras letras do epíteto específico + código para a região alvo (GH para o gene da hormona do crescimento, Bact para o promotor β - actina e AFP para o promotor AFP) + posição 5' do *primer*, na sequência de referência (Tabela 7) + F ou R (para identificar se é *primer Forward* ou *Reverse*). A abreviatura " Salmoni " (para Salmonídeos) ou " Cypri " (para Ciprinídeos) foram usadas para os *primers* específicos de famílias, seguido pela mesma nomenclatura acima descrita. Por exemplo, "SalmoniGH1397F" designa um *primer Forward* para Salmonídeos, gene da hormona do crescimento começando na posição 1397 da sequência de referência e "CcarBact1071R" designa um *primer Reverse* para promotor β - actina começando na posição 1071 da sequência de referência. Para garantir que os *primers* PCR são específicos para cada espécie ou família (ou seja, que eles não amplificam outras espécies), colocamo-los em regiões únicas para cada espécie (ou família), preferencialmente com sequências específicas das espécies na posição 3'.

Também evitamos desenhar os *primers* em regiões com polimorfismos intraespecíficos que poderiam comprometer a ligação dos *primers* e/ou originar

fragmentos amplificados com tamanhos variáveis. As posições polimórficas foram detetadas por inspeção dos alinhamentos de sequências para cada espécie realizadas com várias sequências depositadas no GenBank. A potencial ligação entre todos os *primers* foi testada utilizando o programa AutoDimer [72].

Tabela 7: Lista de *primers* de PCR utilizados no ensaio PCR multiplex para a deteção de elementos transgênicos utilizados em peixes geneticamente modificados.

Alvo	Nome do <i>primer</i>	Sequência <i>primer</i> (5'-3')	Ampliação (nt)	Tm (°C)	Tamanho
Promotor AFP Ocean Pout	ZameAFP1447F	CATTCTGTATTTTCCAATAGCTAAC	260	60,1	26
	ZameAFP1706R	GGGGTAAAAAGCAAGCTGAGA		69,5	21
	ZameAFP1447F	CATTCTGTATTTTCCAATAGCTAAC	304	60,1	26
	ZameAFP1750R	AATTTGAACCCCTGTGACAACGG		60,1	22
	ZameAFP1779F*	ATACACATTTTATCCGTAAGCATG	269	59,2	25
	ZameAFP2047R*	GTATGTGGGAGGACTTAACCG		61,2	21
	ZameAFP1067F	CAAGGAACCTTGTCTAATCAATTTTC	271	59,2	25
	ZameAFP1337R	AAGACAGATATCACATTCGCTTC		59,2	23
	Promotor β-actina Carpa comum	CcarpBact845F	GCTGAAAAGAGCCCTTATTGGC	227	59,5
CcarpBact1071R		AGCTCTGCGCTCTGATTGGT	60,5		20
CcarpBact855F*		GCCTTATTGGCGTTATCACAAC	229	60,1	22
CcarpBact1083R*		GTAAACTTTTCGGAGCTCTGCG		61,2	21
Promotor β-actina Carpa capim	CideBactin15F*	CCTAGGCCTTGTCTTCAGCT	181	61,2	21
	CideBact195R*	AGCTCTTTTATATGACGGCATATG		60,3	24
GH da tilápia do nilo	OnilGH939F*	TGTCGATCTCCTATGGACTGG	125	61,2	21
	OnilGH1063R*	CAGCAGCAAAGATCCCGTTTT		59,5	21
GH Ciprinídeos (Carpa comum, Carpa capim, carpa Rohu)	CypriGH22F*	TGGTGCTGGTTAGTTTGTGGT	100	60,1	22
	CypriGH388R*	GCCAGCTGGTGCAGGTGT		60,8	18
GH Salmonídeos (salmão do Atlântico, salmão Rei, truta arco-íris)	SalmoniGH1397F*	GGTACCCTGTTGCTGATGAA	80	61,2	21
	SamoniGH1476R*	CTCACGATGGAGTCAGAGTTA		59,5	21

*primers utilizados no PCR multiplex final

Amostras

Foram recolhidas amostras de todas as espécies que fornecem elementos genéticos utilizados em peixes geneticamente modificados (Tabela 8). As amostras recolhidas foram obtidas a partir de três fontes diferentes: 1) tecido muscular de produtos de peixes comprados num supermercado; 2) tecido fino recolhido em peixes do Biotério de Organismos Aquáticos (BOGA) do CIIMAR (<http://www.ciimar.up.pt/boga/>) e 3) amostras de DNA fornecidas pelo banco de DNA "Ocean Genome Legacy (OGL)". O OGL forneceu duas amostras distintas do *Zoarcetes americanus* e uma delas, GMF12, resultou na

amplificação de todo o genoma de uma amostra de um tecido preservada em etanol durante 17 anos na Divisão de Ictiologia, Instituto da Biodiversidade, Universidade do Kansas, EUA.

Tabela 8: Amostras usadas neste trabalho

Amostras	Nome científico	Nome comum	Origem
GMF1	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Salmão do Pacífico	Supermercado
GMF2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	Supermercado
GMF3	<i>Salmo salar</i>	Salmão do Atlântico	Supermercado
GMF4	<i>Salmo salar</i>	Salmão do Atlântico	Supermercado
GMF 5	<i>Salmo salar</i>	Salmão do Atlântico	Supermercado
GMF 6	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa comum	BOGA
GMF 7	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia do nilo	BOGA
GMF 8	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	BOGA
GMF 9	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	OGL
GMF 10	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Salmão rei	OGL
GMF 11	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa capim	OGL
GMF 12	<i>Zoarces americanus</i>	Ocean pout	OGL
GMF13	<i>Zoarces americanus</i>	Ocean pout	OGL

Amplificação singleplex e PCR multiplex

Inicialmente, todos os pares de *primers* foram testados em singleplex num volume total de 10 µl com o seguinte protocolo: 5 µl da PCR multiplex master mix (Qiagen), 2 µl de água estéril, 1µl de *primer Forward* e outro de *primer Reverse*, ambos a uma concentração de 2µM, e 1 µl de DNA (template). No caso do PCR multiplex utilizou-se as seguintes condições: passo inicial a 95°C durante 15 minutos, 94°C por 30 segundos durante 35 ciclos, 58°C durante 1 minuto e 30 segundos e 72°C durante 1 minuto com uma extensão final de 72°C durante 10 minutos. Posteriormente, em alguns dos PCRs, os *primers* foram testados a temperaturas de 60°C e 62°C.

A preparação do PCR foi sempre realizada numa sala pré-PCR. Utilizamos sempre um controlo negativo que incluiu todos os nossos componentes de PCR, menos o DNA (template) que foi substituído por água.

Separação electroforética e sequenciação

Todos os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, a 140V durante 45-50 minutos. Os fragmentos foram visualizados sobre luz UV no ChemiDoc™ XRS Imaging System (Bio Rad, USA) com o software Quantity One V4.6.9 (Bio Rad). O gel foi preparado da seguinte forma: pesou-se 2g de agarose num matraz e

adicionou-se 100 mL de TBE a 0.5X. Dissolveu-se a agarose e adicionou-se a mistura 5µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific).

Deteção da sequência transgênica inserida no salmão AquAdvantage

Para superar a ausência de material de referência (peixes transgênicos e/ou DNA transgênico), simulamos um método de clonagem molecular que nos permitiu a obtenção do *construct* inserido no salmão AquAdvantage. Começamos por desenhar um *primer* através do alinhamento, de um *construct* sintético (opAFP-GHc) com o número de acesso AY594644.1 utilizado para o desenvolvimento do peixe transgênico por forma a obtermos um template da junção promotor-região de codificação. Desenvolvemos um *primer Reverse* e um *Forward* para a amplificação do promotor AFP. A cauda 5' com uma sequência complementar para o exão 1 e parte inicial do exão 2 da hormona do crescimento foi adicionada ao *primer Reverse* (fig. 6). Para amplificação dos produtos resultantes do PCR com cauda desenhamos outros pares de *primers*, isto é, *primers Forward* na extremidade 3' do promotor AFP e *primers Reverse* no exão 2 da GH do salmão Rei. As características de todos os *primers* encontram-se na tabela 9.

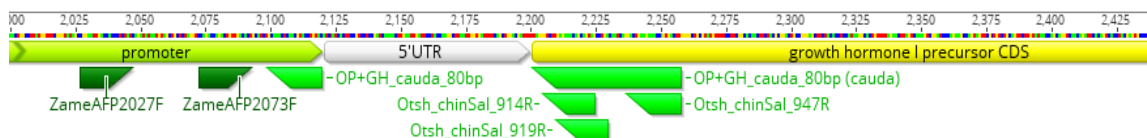


Figura 6: Sequência transgênica utilizada para produzir o salmão AquAdvantage juntamente com os *primers* concebidos para a sua amplificação por PCR

Tabela 9: *Primers* desenvolvidos para amplificação do *construct* inserido no salmão GM

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho
OP+GH_tail	CTTGACTCAGGAAACAACCTGACCAAGTAAGA CTGGCATCAGCAGAAACAATTGTCCCATAG ATCTGGATCGAAGTGAAAGC	80
ZameAFP2027F	CGGTTAAGTCCTCCCAATAC	21
ZameAFP2073F	CTGTCCTGTCAAGGTCTCAG	21
Otsh_chinSal_914R	GCATCAGCAGAAACACTTGTC	21
Otsh_chinSal_919R	GACTGGCATCAGCAGAAACAC	21
Otsh_chinSal_947R	CTTGACTCAGGAAACAACCTGAC	22

Resultados e discussão

PCR singleplex e multiplex

Inicialmente, começamos com o alinhamento de várias sequências do gene da hormona do crescimento de diferentes espécies. Do alinhamento foi-nos possível concluir que, apesar de ser um gene conservado, apresentava polimorfismos suficientes para permitir a discriminação entre as diferentes espécies. Por exemplo, foram encontradas 43 diferenças de nucleótidos entre a carpa comum e o salmão do Atlântico, no exão 2 das sequências de referência, com um comprimento aproximado de 140 pb (fig. 7). Estas diferenças permitem garantir que os *primers* de PCR específicos da espécie podem ser concebidos de forma a evitar amplificações indesejadas. Por exemplo, os *primers* para a hormona do crescimento da tilápia do nilo são específicos para o seu target, uma vez que o *primers* Forward difere na posição 3' (fig. 8).

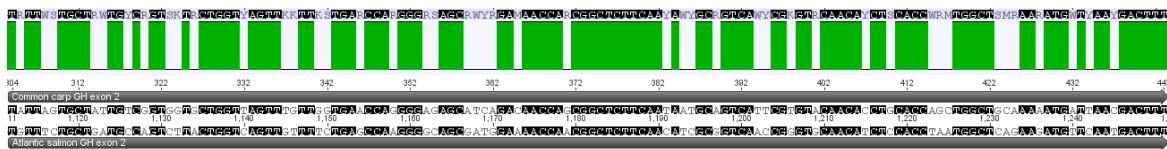


Figura 7: Alinhamento das sequências entre a carpa comum e do salmão do Atlântico do exão 2 da hormona do crescimento.

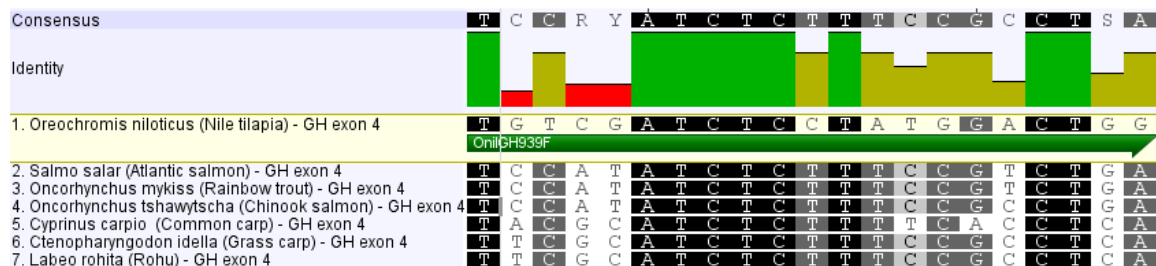


Figura 8: Alinhamento de sequências do exão 4 da hormona do crescimento para a ligação do *primer* Forward utilizado no nosso ensaio. O *primer* da tilápia do nilo tem duas diferenças de nucleótidos nas últimas 5 posições no sentido 3', quando comparado com as restantes espécies.

Foi-nos igualmente possível identificar regiões conservadas no gene da hormona do crescimento para a deteção simultânea de diferentes espécies de Salmonídeos e Ciprinídeos, a fim de reduzir o número de regiões amplificadas no multiplex final. O desenho de *primers* dentro das regiões conservadas nestes dois grupos taxonómicos permite a sua discriminação por eletroforese em gel de agarose convencional.

Após concluído o desenho dos *primers*, testamos a eficácia dos mesmos nas nossas amostras de referência em PCR singleplex. O DNA das amostras foi previamente extraído pelo método fenol-clorofórmio e a veracidade das amostras para as espécies requeridas foi testada com recurso a uma abordagem do DNA barcoding. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose (fig. 9) e em eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) (fig. 10). As regiões alvo foram amplificadas com sucesso em todas as amostras, com todos os produtos de amplificação a apresentar o tamanho esperado. Posteriormente, todos os produtos de PCR foram sequenciados de forma a confirmar a correta amplificação da região de interesse.

Sempre que possível, foram testadas amostras adicionais para cada espécie (Tabela 10), de modo a avaliar a eficiência dos *primers* na presença de possíveis polimorfismos intra-espécies. Verificou-se ampliações bem-sucedidas em todas as amostras testadas, nomeadamente em 3 amostra de salmão do Atlântico e 3 trutas arco-íris. Também testamos diferentes espécies de salmonídeos e ciprinídeos (Tabela 10), tendo todos eles amplificados com sucesso.

Tabela 10: Espécies testadas para os grupos dos salmonídeos e ciprinídeos

Grupo	Espécies	Origem
Salmonídeos	<i>Salmão rosa (Oncorhynchus gorbuscha)</i>	Supermercado
	<i>Truta arco-íris (Oncorhynchus mykiss)</i>	Supermercado
	<i>Salmão do Atlântico (Salmo salar)</i>	Supermercado
	<i>Salmão do Atlântico (Salmo salar)</i>	Supermercado
	<i>Salmão do Atlântico (Salmo salar)</i>	Supermercado
	<i>Truta arco-íris (Oncorhynchus mykiss)</i>	BOGA
	<i>Truta arco-íris (Oncorhynchus mykiss)</i>	OGL
	<i>Salmão rei (Oncorhynchus tshawytscha)</i>	OGL
Ciprinídeos	<i>Carpa comum (Cyprinus carpio)</i>	BOGA
	<i>Carpa capim (Ctenopharyngodon idella)</i>	OGL

De um modo geral, estes resultados demonstraram que os *primers* têm uma boa eficiência na configuração PCR singleplex, uma vez que, todas as regiões alvo foram amplificadas com sucesso e com o comprimento esperado (fig. 9).

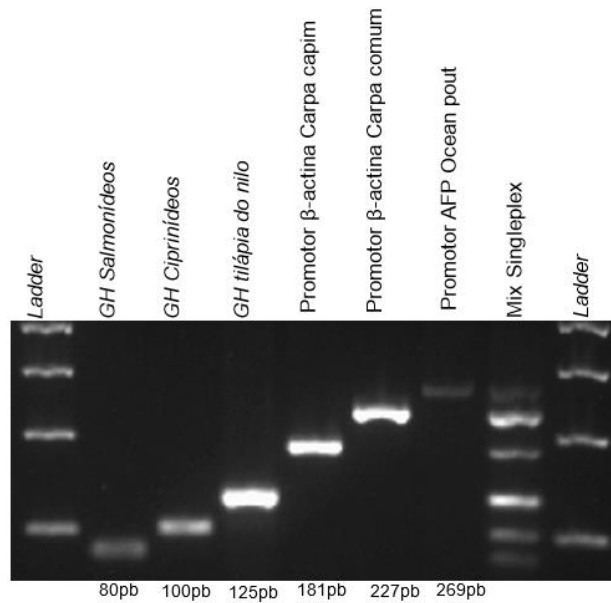
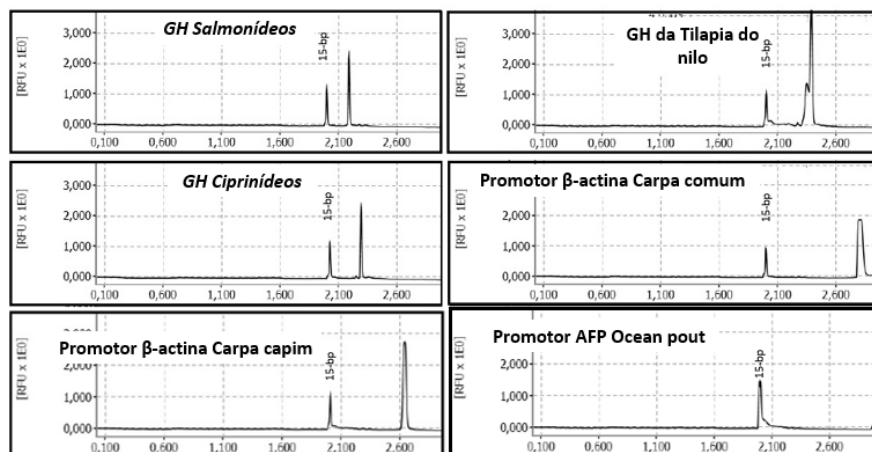


Figura 9: Teste de PCR singleplex dos pares de *primers* concebidos para inclusão no PCR multiplex para deteção de peixes geneticamente modificados. As regiões-alvo e uma mistura de produtos amplificados (“mix singleplex”) foram separadas em gel de agarose a 2%. Utilizou-se uma ladder de 100pb.

Os produtos de PCR singleplex também foram analisados em eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) para confirmação de que todas as regiões alvo foram amplificadas com sucesso (fig.10). Uma mistura dos produtos de PCR amplificados de diferentes regiões alvo foram analisadas a fim de verificar se as regiões amplificadas a serem incluídas no multiplex podem ser facilmente separadas em eletroforese capilar e convencional. Os produtos amplificados foram claramente separados em ambos os sistemas de eletroforese, sugerindo que eles podem ser utilizados com sucesso na configuração multiplex (Figs. 9 e 10).



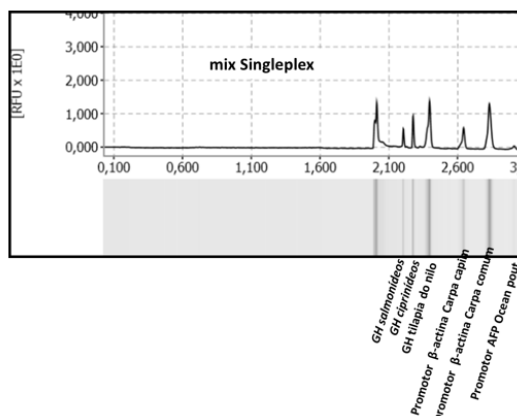


Figura 10: Teste de PCR singleplex dos pares de *primers* concebidos para inclusão no PCR multiplex para deteção de peixes GM. As regiões-alvo e a mistura de produtos amplificados (“mix singleplex”) foram separados em eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel). O pico à esquerda representa o controlo interno de 15 pb.

Como podemos verificar na figura 9, obtivemos uma amplificação mais fraca para o promotor AFP do *Ocean pout*. Este resultado, provavelmente deve-se à baixa qualidade do DNA na amostra, uma vez que, se trata de uma amplificação de todo o genoma e em uma amostra com 17 anos de idade conservada em etanol. De forma a contornar o resultado obtido, foi-nos cedida pelo OGL uma outra amostra. Assim, uma nova reação de PCR foi realizada na qual testamos 3 pares de *primers* para as duas amostras do promotor AFP (GMF12 e GMF 13).

Foi-nos possível concluir que o par de *primers* ZameAFP1779F e Zame2047R originou uma amplificação específica para as duas amostras ao contrário do que se verificou para os restantes pares de *primers* que não obtiveram qualquer produto de amplificação. Apesar de obtermos uma amplificação para ambas as amostras, é evidente a diferença de resultados. Observou-se uma amplificação com maior resolução do fragmento gerado pela nova amostra (GMF13) em comparação com o fragmento gerado pela amostra com 17 anos de idade (GMF12) o que nos leva a concluir que existe uma diferença de qualidade de DNA entre as duas amostras (fig. 11).

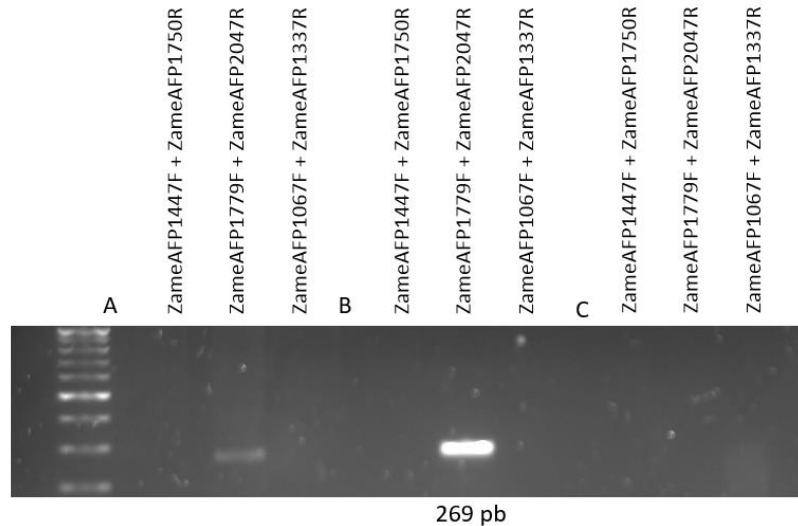


Figura 11: Teste de PCR singleplex dos pares de *primers* desenvolvidos para multiplex e detecção do promotor AFP em duas amostras (GMF 12 e 13) em gel de agarose a 2% e uma temperatura de *annealing* de 58°C. A- Amostra GMF12, B- Amostra GMF13 e C- controle negativo.

Foram realizados vários testes de especificidade com os nossos *primers* de PCR usando o DNA de espécies não-alvo. A uma temperatura de ligação de 58°C, para o promotor β -actina da Carpa comum os *primers* não foram específicos para o seu alvo, uma vez que foi verificada uma amplificação inespecífica para amostra da Carpa capim (fig.12).

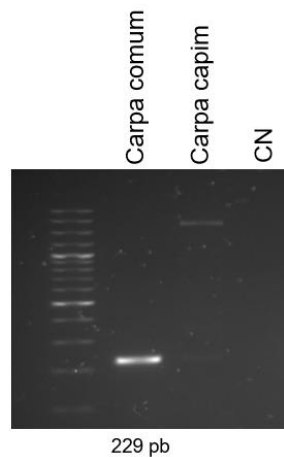


Figura 12: Teste de especificidade para o par de *primers* concebido para inclusão no PCR multiplex e detecção do promotor β -actina da Carpa comum. Realizado a uma temperatura de 58°C.

Para contornar a amplificação indesejada verificada para o promotor β – actina da Carpa comum, redesenhamos um novo par de *primers*. Assim, realizamos um novo PCR, em que foram testados o novo par de *primers* e todas as combinações possíveis entre os dois conjuntos de *primers* (*Forwards* vs *Reverses*) para as amostras da Carpa comum e Carpa capim. Todos os conjuntos de *primers* mostraram ser eficientes na amplificação do promotor β – actina da Carpa comum, no entanto, com diferenças claras entre os

resultados obtidos. O novo par de *primers* mostrou ser mais eficiente na amplificação do promotor da Carpa comum do que o conjunto inicialmente concebido, além de que, não exibiu uma amplificação inespecífica para a Carpa capim. A combinação CcarpBact845F com CcarBact1083R demonstrou ser igualmente eficiente na amplificação do promotor da Carpa comum, no entanto, comparando o resultado entre os dois pares de *primers*, a amplificação para o par CcarpBact855F e CcarBact1083R, mostrou uma banda com maior resolução (fig. 13). O *primer Reverse* CcarpBact1071R quando conjugado com os dois *primers Forward* demonstrou amplificação inespecífica para a Carpa capim. A semelhança na região de ligação do *primer Reverse* para o promotor β -actina em ambas as sequências, carpa comum e Carpa capim, pode ser uma explicação para este resultado, embora nenhuma sequência genómica para o promotor β -actina da Carpa capim esteja disponível para a região de ligação do *primer Forward*.

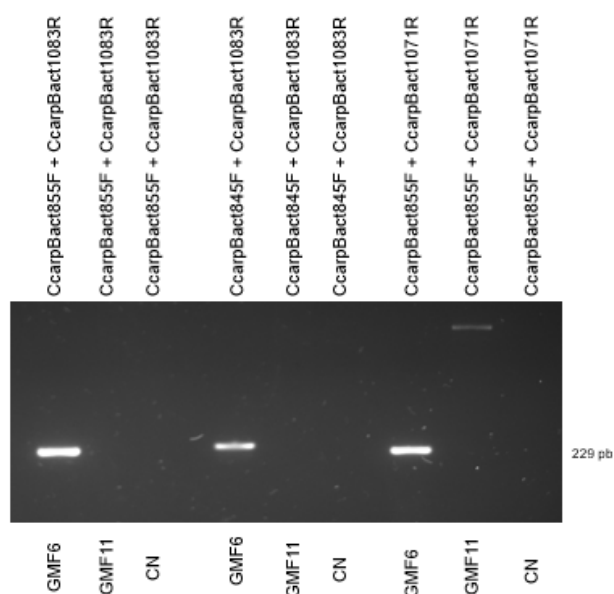


Figura 13: Teste de PCR singleplex dos *primers* do promotor β -actina da Carpa comum desenvolvidos para serem incluídos no PCR multiplex, a uma temperatura de *annealing* de 58°C. GMF6- Carpa comum; GMF 11- Carpa capim; CN- controlo negativo

Após solucionarmos os problemas anteriormente descritos, testamos a sensibilidade dos nossos *primers* em PCR singleplex utilizando gradientes de temperatura de *annealing* entre os 58°C e 62°C (fig. 14). Observamos algumas amplificações inespecíficas para todas as amostras, a uma temperatura de *annealing* de 58°C (fig. 14 A). Para as temperaturas de *annealing* a 60°C e 62°C (fig. 14 B e C) apenas o DNA das espécies alvo foi amplificado. No entanto, a uma temperatura de 62°C verificamos bandas com maior resolução (fig. 14C). Ao mesmo tempo que testamos qual temperatura que melhor se adequa aos nossos *primers*, foi-nos igualmente possível aferir acerca da especificidade dos *primers*. Por exemplo, isto pode ser demonstrado pelos *primers* específicos de

famílias. Os *primers* para a hormona do crescimento dos salmonídeos apenas amplificaram para a Truta arco-íris e salmão do Atlântico e os *primers* para a hormona do crescimento dos ciprinídeos apenas amplificou nas carpas. Tanto a Carpa comum como a Carpa capim apresentam duas bandas específicas. A carpa comum exibe uma com 229 pb, correspondente ao promotor β -actina e outra com 100 pb para a hormona do crescimento dos ciprinídeos. A Carpa capim apresenta igualmente duas bandas, uma com 181 pb representativa do promotor β -actina e outra de 100 pb para a hormona do crescimento dos ciprinídeos.

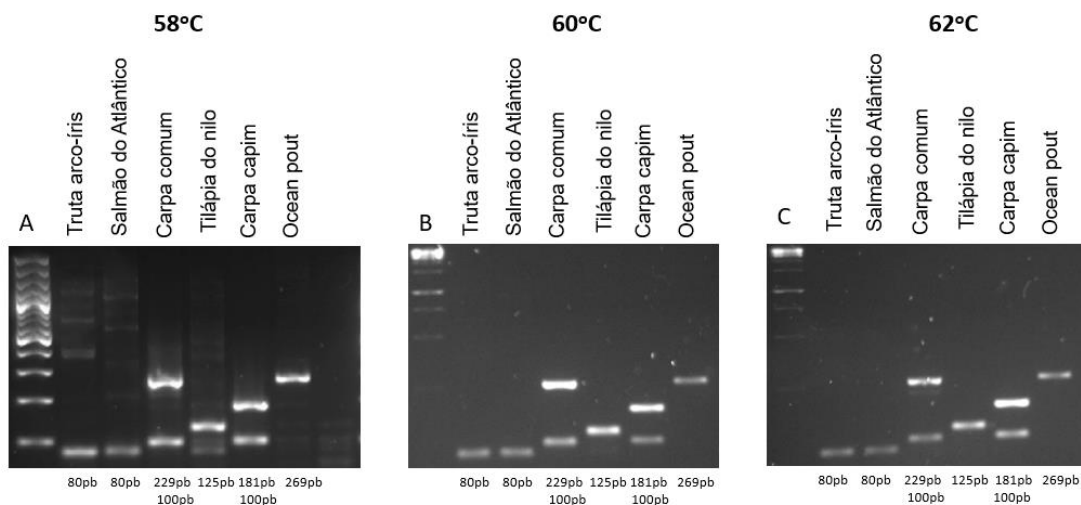


Figura 14: PCR singleplex para a deteção de peixes GM testados sobre um gradiente de temperaturas de *annealing* num gel de agarose a 2%. Utilizou-se uma ladder de DNA de 100 pb.

Após testarmos qual a melhor temperatura de ligação para os *primers* de PCR, realizamos testes de especificidade dos mesmos usando DNA de espécies não-alvo. Os *primers* para o promotor β -actina da Carpa capim, hormona do crescimento dos salmonídeos, promotor AFP do *Ocean pout* e hormona do crescimento da tilápia do nilo revelaram ausência de amplificações inespecíficas e apenas o DNA da espécie alvo foi amplificado (Fig.15 B, C, F, E). Estes resultados estão de acordo com o alinhamento de seqüências das regiões de ligação dos primers, em que, pelo menos um dos *primers* tem posições variáveis nas últimas cinco posições da extremidade 3' quando comparado com a espécie não-alvo (Figs. 16 A, B e C). Para o promotor AFP era esperado uma elevada especificidade pois este gene está ausente nas restantes espécies testadas neste trabalho. Os *primers* para a deteção do promotor β -actina da Carpa comum e para a família dos ciprinídeos não foram específicos para o seu alvo, uma vez que se observou amplificação inespecífica para a amostra referente à tilápia do nilo (fig. 15 A e D). Estes

resultados não seriam de esperar, uma vez que, apesar de pertencerem a mesma classe Actinopterygii, a tilápia do nilo e a Carpa comum pertencem a ordens e famílias diferentes. No entanto, realizamos uma pesquisa BLAST usando a sequência do promotor β -actina da carpa comum. A sequência com o número de acesso AY116536, correspondente ao gene β -actina da tilápia do nilo foi alinhada com a sequência do promotor β -actina da carpa comum, a fim de se averiguar se existiam diferenças no local de encaixe dos *primers*. Desta forma foi-nos possível verificar que a região de ligação do *primer Reverse* para o promotor β -actina da carpa comum é em grande parte semelhante à sequência extraída para a tilápia do nilo (fig. 17).

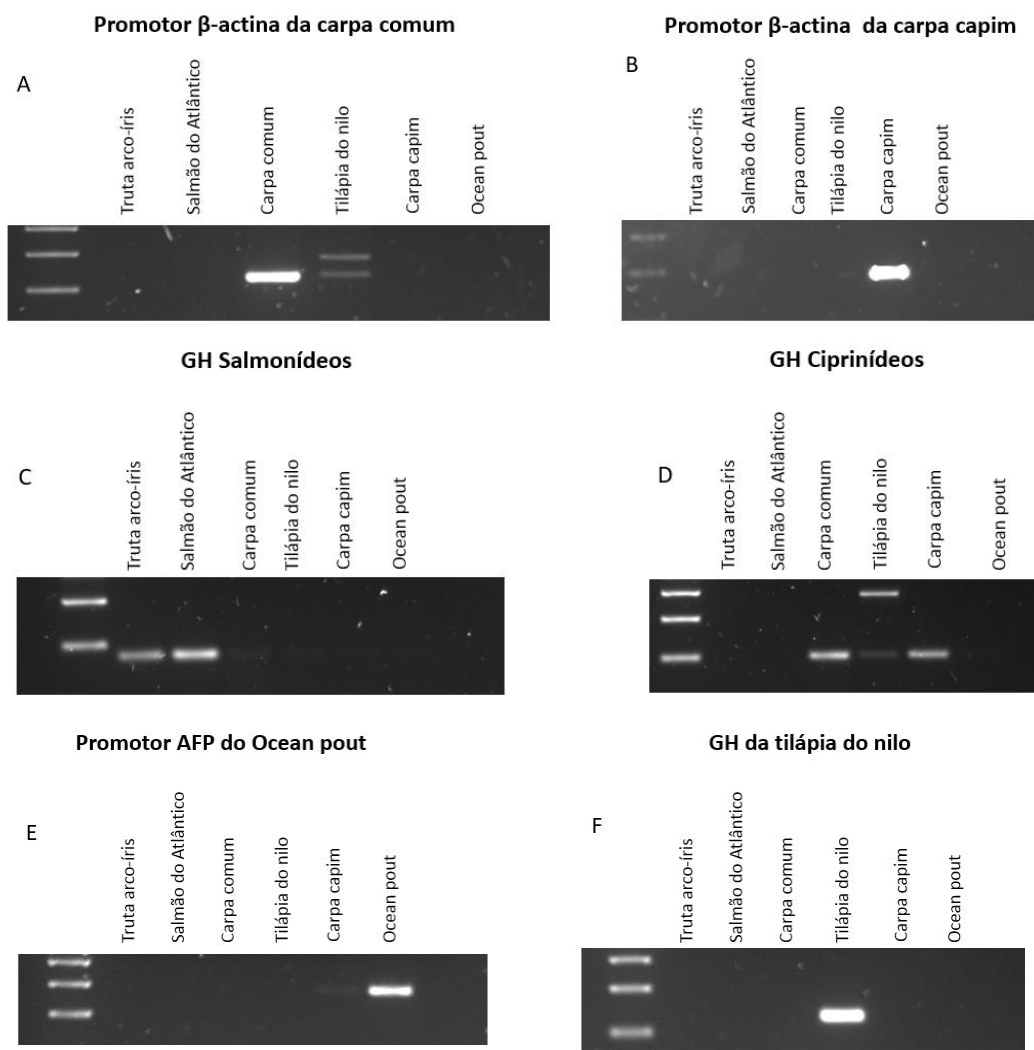


Figura 15: Teste de especificidade para os pares de *primers*, a uma temperatura de *annealing* de 62°C, concebidos para inclusão no PCR multiplex para deteção de peixes GM. A- promotor β -actina Carpa comum; B- promotor β -actina Carpa capim; C- GH salmonídeos; D- GH ciprinídeos; E- promotor AFP Ocean pout e F- GH tilápia do nilo.

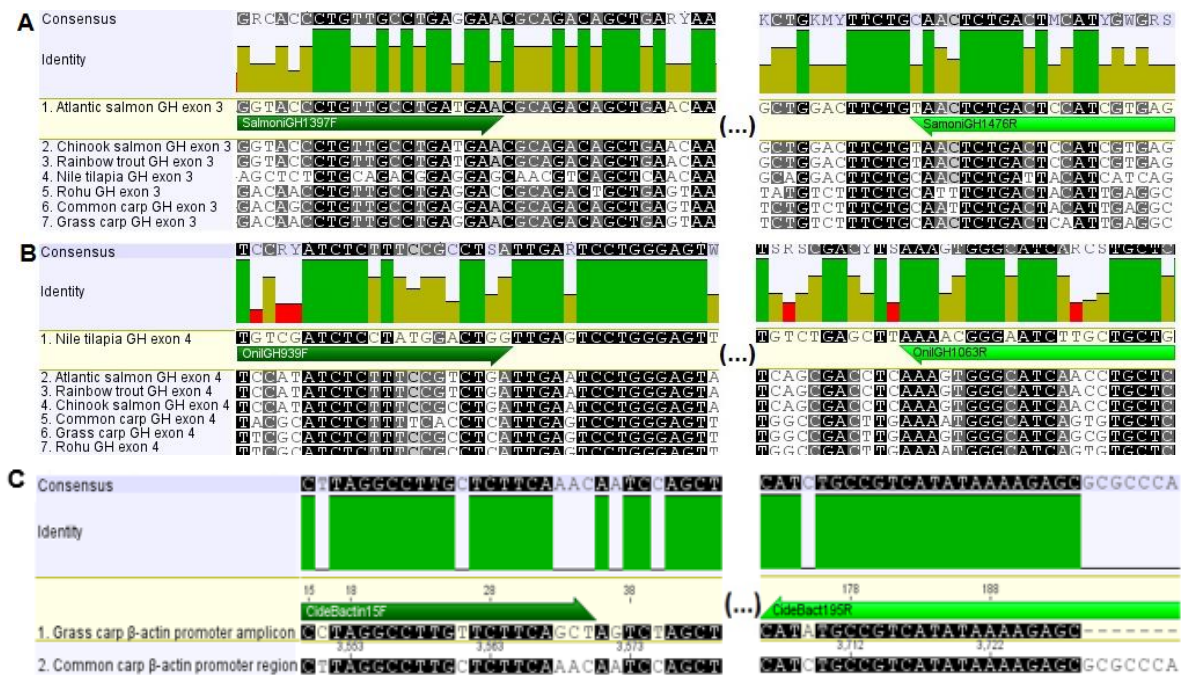


Figura 16: Alinhamento da hormona do crescimento no exão 3 (A), exão 4 (B) e promotor da β – actina da Carpa capim (C). As setas a verde indicam a localização dos *primers* de PCR.

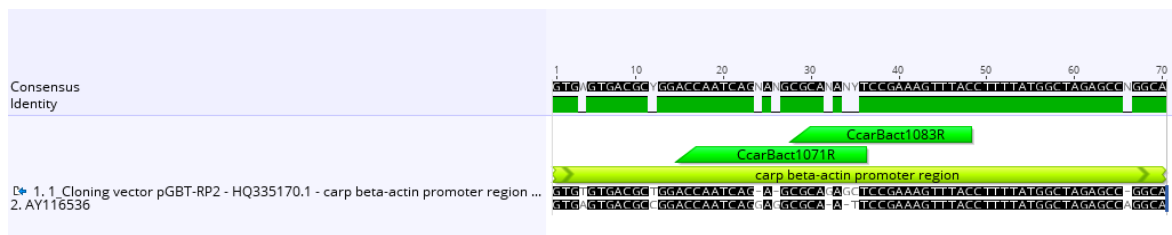


Figura 17: Alinhamento da sequência do promotor da β – actina da Carpa com no local de encaixe do *primer Reverse* com a sequência da β – actina da tilápia do nilo

O desenvolvimento e otimização de um método de PCR multiplex apresenta várias dificuldades, como tal, é preciso ter em consideração vários fatores tais como o desenho dos *primers*, (comprimento, teor GC, concentração e temperatura de *annealing*), concentração do template e o número de ciclos [61, 73]. É importante ter em conta estes fatores por forma a evitar efeitos competitivos pois a presença de mais de um par de *primers* aumenta a hipótese de formação de dímeros uma vez que, estes produtos não específicos podem ser amplificados de forma mais eficiente do que as regiões alvo, consumindo componentes da reação e diminuindo as taxas de eficiência de *annealing* e extensão [73]. Assim, antes do PCR multiplex testamos os nossos *primers* no programa AutoDimerV1 [74]. Não foram detetadas interações entre os *primers*, o que sugere que os *primers* podem ser utilizados em reações multiplex.

Para verificar se o ensaio PCR multiplex teve uma boa eficiência na amplificação de todas as sequências alvo, tal como se verificou para o PCR singleplex, testamos a sensibilidade do PCR multiplex a uma temperatura de 62°C, temperatura na qual obtivemos melhor eficiência de emparelhamento dos *primers*. Para tal, procedemos a duas eletroforeses distintas, eletroforese em gel de agarose (fig. 18) e eletroforese capilar (fig. 19). Em ambos os sistemas, o PCR multiplex mostrou-se eficiente para todos os *primers* testados. Não se verificou qualquer amplificação inespecífica, os fragmentos obtidos com os tamanhos teóricos esperados, bandas claras e fortes a exceção do promotor β -actina da Carpa comum que exibiu uma banda um pouco fraca em relação às outras.

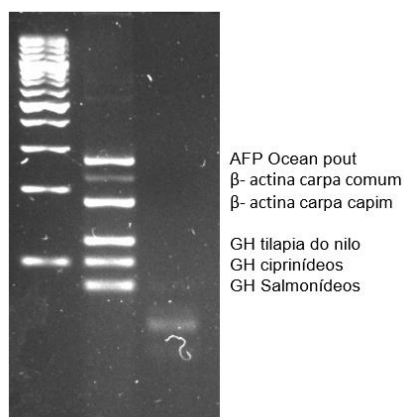


Figura 18: PCR multiplex para a deteção de peixes GM testados a 62°C sobre um gel de agarose a 2%. Utilizou-se uma ladder de DNA de 100pb.

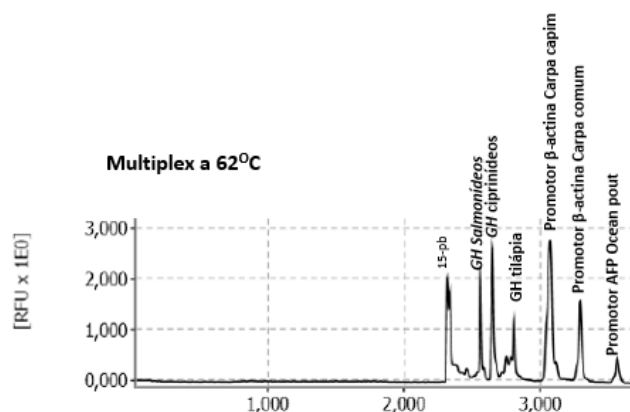


Figura 19: PCR multiplex para a deteção de peixes GM a uma temperatura de *annealing* de 62°C para o método de deteção em eletroforese capilar (sistema QIAxcel).

Deteção da sequência transgênica inserida no salmão AquAdvantage

Para o desenvolvimento do método de deteção e identificação do salmão AquAdvantage, recentemente aprovado como primeiro animal transgênico para consumo humano, contactamos por diversas vezes a empresa AquaBounty technologies por forma a obtermos uma amostra transgênica. Como foi-nos sempre negada a colaboração por

parte da empresa e dada a ausência de material transgênico de referência tentamos simular em laboratório a sequência utilizada para produzir o salmão transgênico.

Assim, para gerar o nosso fragmento de interesse, desenhamos um *primer Reverse* com 22 pb para o promotor AFP do *Ocean pout* com uma cauda na extremidade 5', com 58pb, complementar à sequência 5' do exão 1 e parte inicial do exão 2 do gene da hormona do crescimento do salmão do rei (*Oncorhynchus tshawytscha*). De seguida, fizemos um PCR com o *primer Reverse* com cauda e um *primer Forward* anteriormente utilizado para a amplificação da amostra do *Ocean pout* e como template a própria amostra do *Ocean pout*. Após PCR, obtivemos um template da junção entre a região do promotor AFP (promotor) com a hormona do crescimento do salmão rei (região de codificação). Para comprovar que o fragmento amplificado era a sequência transgênica que pensamos ser a utilizada no salmão AquaAdvantage, os nossos produtos de PCR foram sequenciados a fim de verificar a correta amplificação. A sensibilidade do nosso PCR foi testada em um gradiente de temperaturas de *annealing* com um intervalo entre 50°C-65°C. Foi demonstrada uma maior sensibilidade dos *primers* a baixas temperaturas, sem ampliações inespecíficas e com o comprimento teórico esperado (fig. 20).

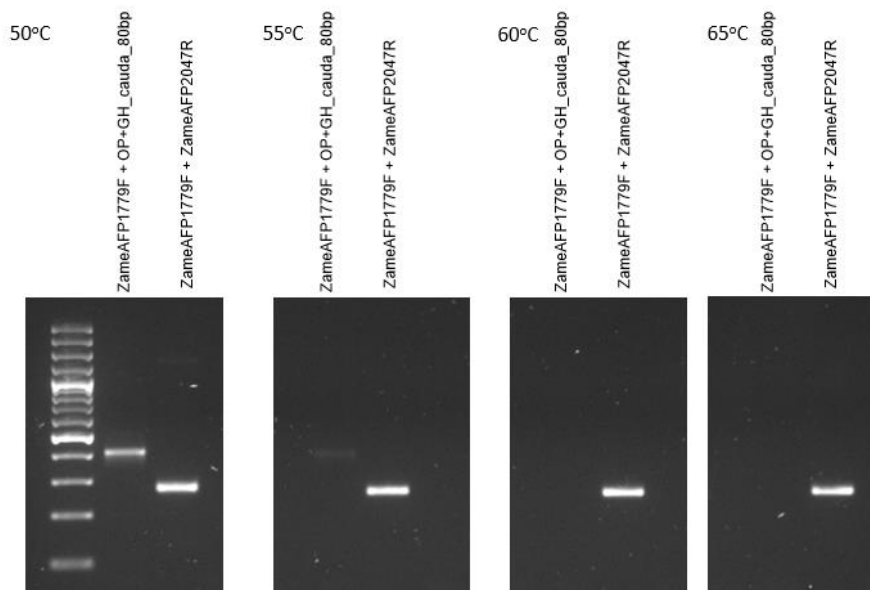


Figura 20: PCR singleplex para amplificação do *primer* cauda testado a diferentes gradientes de temperatura de *annealing*.

Após conseguirmos recriar parte da sequência transgênica introduzida pela AquaBounty no salmão transgênico, desenvolvemos um método PCR singleplex específico para deteção da junção promotor-região de codificação desta construção transgênica. Para tal, desenhamos *primers* de forma a amplificar a junção entre os dois fragmentos transgênicos que constituem o *construct*, o promotor AFP do *Ocean pout* e a hormona do crescimento do salmão rei. Assim, foram desenhados, através do alinhamento

da sequência transgênica, dois *primers Forward* perto da extremidade 3' do promotor AFP e 3 *primers Reverse* na extremidade 5' da hormona do crescimento do salmão rei.

Para a deteção do transgene, os *primers* foram adicionados à solução resultante dos produtos amplificados do PCR anterior, previamente diluída e processados a uma temperatura intermédia do gradiente utilizado no primeiro PCR. Verificou-se que todas as conjugações de *primers* (*Forward vs Reverse*) amplificaram com sucesso a sequência transgênica. No entanto, a conjugação com o *primer* ZameAFP2027F mostrou ser a mais eficiente na amplificação da sequência transgênica quando comparada com a conjugação com o *primer* ZameAFP2073F. Para além de apresentarem bandas de menor resolução, num dos casos verificou-se uma fraca amplificação (fig. 21). Uma vantagem dos nossos *primers* é o facto de amplificarem amplicões curtos, ideais para análise de amostras de DNA degradado, tais como produtos alimentares transformados.

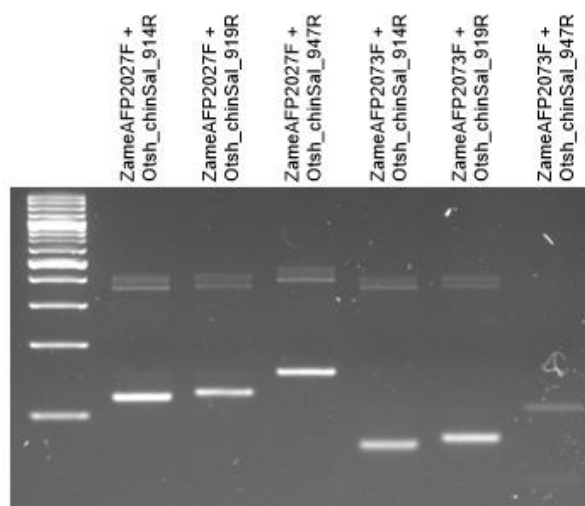


Figura 21: PCR singleplex dos *primers* concebidos para amplificar a sequência transgênica que pensamos ser a utilizada no salmão AquAdvantage, a uma temperatura de 57°C.

Recentemente, foi publicado um estudo na qual tentou-se desenvolver uma técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para a deteção e quantificação do gene da hormona do crescimento do *Salmo salar* (salmão do Atlântico) [53]. O principal objetivo do estudo era o desenvolvimento de um método capaz de distinguir entre os salmões transgênicos e não-transgênicos através da quantificação da hormona do crescimento de duas amostras. Apesar de a técnica apresentar resultados promissores, a sua aplicação para uso na rotina de análises de identificação e deteção de organismos geneticamente modificados não parece ser a mais adequada pois o salmão transgênico produz exatamente a mesma proteína que o salmão selvagem apenas numa taxa superior. O mesmo poderá acontecer na natureza, encontrar um salmão que produza a proteína em excesso, apresentando os mesmos valores de concentração da hormona do crescimento

que um salmão transgênico. Assim, através desta técnica não é possível distinguir com segurança o padrão proteico da hormona do crescimento entre o salmão transgênico e o salmão selvagem.

Em contrapartida, com a metodologia desenvolvida durante o nosso trabalho, foi-nos possível ultrapassar a ausência de material de referência e posteriormente desenvolver um método molecular de deteção, específico para compreender a junção dos elementos genéticos que constituem o *construct*. Ao contrário do que é verificado no caso apresentado, a presença da junção destes dois elementos numa amostra indica-nos, inequivocamente, que estamos diante de uma amostra transgênica. A junção destes dois elementos não ocorre espontaneamente na natureza, apenas é possível recorrendo a ferramentas laboratoriais. Espera-se que a aprovação do salmão AquAdvantage vá criar um precedente para futuras aprovações de mais animais transgênicos [44] ao mesmo tempo aguarda-se que a UE desenvolva e aprove legislação sobre a venda de animais geneticamente modificados [53]. Os métodos de deteção são uma parte integrante do processo de aprovação regulamentar sobre organismos geneticamente modificados [75]. Assim, esperamos ter desenvolvido o primeiro método de identificação específica do *construct*, inserido no salmão AquAdvantage, e consequentemente, uma estratégia que pode ser facilmente adaptada a qualquer outro animal geneticamente modificado a ser colocado no mercado futuramente.

Conclusão

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento do número de organismos geneticamente modificados. Ao mesmo tempo que este valor aumenta na União Europeia, verifica-se um aumento na mesma proporção de regulamentação para este tipo de produtos. O constante surgimento de organismos geneticamente modificados e, com a recente aprovação para consumo do primeiro animal transgénico, é necessário desenvolver testes para a deteção de organismos transgénicos mais eficientes, de baixo custo e com resultados mais rápidos.

Ensaio de PCR singleplex para a deteção de peixes transgénicos tem sido descritos na literatura [76-79]. No entanto, o PCR multiplex tem a capacidade para reduzir o tempo e custos necessários numa típica análise de rastreio pois permite detetar uma ampla variedade de elementos introduzidos nos organismos geneticamente modificados numa única reação. Apesar da sua vasta aplicabilidade nos mais diversos organismos, ainda não foi desenvolvido nenhum PCR multiplex para animais transgénicos. Assim, o nosso trabalho é uma primeira tentativa para desenvolver um método de PCR multiplex para a deteção de peixes transgénicos. O fluxo de trabalho consistiu na otimização dos *primers* em PCR singleplex, seguido de eletroforese e deteção por tamanho dos fragmentos. A diferença de tamanho entre todos os fragmentos amplificados é suficiente para garantir a identificação por eletroforese. Futuramente, para comprovar a eficácia dos nossos *primers* na amplificação específica das regiões-alvo, seria interessante testar o nosso método de rastreio em DNA de peixes geneticamente modificados, assim que o material de referência (peixes transgénicos e/ou DNA transgénico) tornar-se disponível. A vantagem do PCR multiplex em relação aos restantes métodos de deteção advém do facto de que mais do que uma região alvo pode ser amplificada simultaneamente numa única reação. Esta característica pode ser útil na identificação de diferentes *constructs* que são usados para modificar geneticamente a mesma espécie. Por exemplo, a carpa comum tem sido geneticamente modificada pela introdução de diferentes *constructs*, como o promotor da β -actina da carpa comum ligado ao cDNA da hormona do crescimento da carpa comum [66] e o mesmo promotor surge ligado ao cDNA da hormona do crescimento do salmão rei [39]. Por esta razão, seria necessário mais do que uma reação singleplex, a fim de se verificar se se trata de uma carpa transgénica. Além disto, o nosso ensaio de PCR multiplex foi projetado para amplificar regiões curtas, com menos de 300 pb, o que facilita a obtenção de resultados em amostras com baixas quantidades e/ou DNA degradado. Esta característica é particularmente útil na análise de alimentos processados com suspeita de conter peixes geneticamente modificados. O reduzido tempo de análise também pode ser vantajoso no caso em que seja necessário uma rápida atuação por parte das entidades

reguladoras quanto à retirada e/ou permanência do mercado de determinado produto alimentar pelos mais diversos motivos tais como, a presença de um alimento contendo um organismo geneticamente modificado não aprovado pela legislação ou a presença dos mesmos acima do limiar de rotulagem. Outra vantagem do nosso método é o uso de equipamentos convencionais de laboratório, o que facilmente pode ser adotado por outros laboratórios para uma eficiente triagem de peixes geneticamente modificados.

No que diz respeito ao método desenvolvido para detecção da sequência transgênica no salmão do Atlântico, esta parte da vantagem de não necessitar de material transgênico de referência. Com o conhecimento prévio da sequência inserida e através de métodos moleculares foi-nos possível recriar um modelo do *construct* e desenvolver *primers* específicos para a amplificação da junção criada entre os diferentes elementos transgênicos que compõem o *construct* (promotor AFP e cDNA da hormona do crescimento). Os nossos *primers* foram validados em PCR singleplex e mostraram ser eficientes na amplificação da junção entre o promotor e a região de codificação. Tal como no método anterior, seria interessante testar os *primers* desenvolvidos para amplificar a sequência transgênica introduzida no salmão AquAdvantage em material de referência quando este se encontrar disponível. Os métodos de detecção são parte integrante para a aprovação da comercialização de organismos geneticamente modificados na UE. Assim, o nosso método pode ser um ponto de partida para a alteração legislativa vigente na UE quanto à modificação genética em animais. A metodologia desenvolvida durante o nosso trabalho pode servir para o desenvolvimento e validação de outros métodos baseados em DNA ou como referência em experimentos de validação e que facilmente pode ser adaptado a qualquer outro animal geneticamente modificado a ser colocado no mercado futuramente. De uma perspetiva forense os nossos dois métodos aqui desenvolvidos são um primeiro meio de verificação dos cumprimentos das normas políticas implementadas e consequentemente constituem uma proteção para o consumidor.

O sucesso de um produto no mercado é determinado pela aceitação deste por parte dos consumidores. Para tal, é necessário ter em conta a atitude dos consumidores sobre os alimentos derivados de produtos transgênicos. Uma pesquisa relativamente recente descobriu que a maioria dos consumidores não estava plenamente informada sobre biotecnologia de alimentos [80]. Muitas das pessoas já consomem alimentos e alimentos derivados de organismos geneticamente modificados, por exemplo, fruta e vegetais híbridos, consumo da enzima bacteriana transgênica, quimosina, no queijo parmesão ou insulina geneticamente modificada e não tem a noção da sua origem. Existe uma grande necessidade de educação pública sobre a biotecnologia, vantagens e desvantagens, riscos e benefícios [11]. É necessário desenvolver estratégias de divulgação e promoção

sobre este tema de forma a informar o maior número de consumidores. Embora as atitudes dos consumidores variem amplamente em todo o mundo, um consumidor informado é capaz de fazer escolhas mais acertadas e até mesmo a sua aceitação a este mercado com base naquilo que conhece [80]. Desta forma, o consumidor vê o uso de rotulagem como um meio informativo e de garantir a segurança dos alimentos, daqui surge a necessidade em desenvolver métodos capazes de detetar, identificar e quantificar a presença de organismos geneticamente modificado nos alimentos antes de estes entrarem no mercado. A presença de organismos geneticamente modificado nos alimentos e alimentos para animais não rotulados, a presença de organismos geneticamente modificados não aprovados pela UE e o limiar de rotulagem acima de 0,9% constitui fraude alimentar.

Bibliografia

1. Chen, T.T., J.-K. Lu, and R. Fahs, *Transgenic fish technology and its application in fish production*. A. Altman. Marcel Dekker, NY, USA, 1998: p. 527-547.
2. Žel, J., et al., *How to reliably test for GMOs*. 2012: Springer.
3. Bawa, A.S. and K.R. Anilakumar, *Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review*. J Food Sci Technol, 2013. **50**(6): p. 1035-46.
4. Minunni, M., M. Mascini, and I. Cozzani, *Screening Methodologies for Genetic Modified Organisms (GMOs)*. Analytical Letters, 2000. **33**(15): p. 3093-3125.
5. Permingeat, H.R., M.I. Reggiardo, and R.H. Vallejos, *Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(16): p. 4431-6.
6. Volckaert, F. and F. Ollevier, *Transgenic fish: the future of fish with novel genes*. 1998.
7. Burns, J.C., et al., *Transgenic fish: ideal models for basic research and biotechnological applications*. Zoological Studies, 1995. **34**(4): p. 215-234.
8. Gjedrem, T., N. Robinson, and M. Rye, *The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review*. Aquaculture, 2012. **350–353**: p. 117-129.
9. Rasmussen, R.S. and M.T. Morrissey, *Biotechnology in Aquaculture: Transgenics and Polyploidy*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2007. **6**(1): p. 2-16.
10. Parekh, S.R., *Transgenic Aquatic Animals*, in *The GMO Handbook: Genetically Modified Animals, Microbes, and Plants in Biotechnology*, S.R. Parekh, Editor. 2004, Humana Press: Totowa, NJ. p. 207-216.
11. Dunham, R.A., *Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches*. 2004: CABI.
12. Bawa, A. and K. Anilakumar, *Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review*. Journal of food science and technology, 2013. **50**(6): p. 1035-1046.
13. Van Eenennaam, A.L. and W.M. Muir, *Transgenic salmon: a final leap to the grocery shelf?* Nature Biotechnology, 2011. **29**(8): p. 706.
14. Taylor, S.L., *Food from genetically modified organisms and potential for food allergy*. Environmental toxicology and pharmacology, 1997. **4**(1): p. 121-126.
15. Thomas, T.C., C. Pinwen Peter, and K. Jenny, *Application of Transgenic Fish Technology in Sea Food Production*, in *Food Biotechnology, Second Edition*. 2005, CRC Press.
16. Zbikowska, H.M., *Fish can be First – Advances in Fish Transgenesis for Commercial Applications*. Transgenic Research, 2003. **12**(4): p. 379-389.
17. Cavari, B., et al., *All-fish gene constructs for growth hormone gene transfer in fish*. Fish Physiology and Biochemistry, 1993. **11**(1): p. 345-352.
18. Hilbeck, A., et al., *Environmental risk assessment of genetically modified plants - concepts and controversies*. Environmental Sciences Europe, 2011. **23**(1): p. 1-12.
19. Dunham, R.A. and Z. Liu, *Transgenic fish—where we are and where do we go?* 2006.
20. Zhu, Z., L. He, and S. Chen, *Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (Carassius auratus L. 1758)*. Journal of Applied Ichthyology, 1985. **1**(1): p. 31-34.
21. Brem, G., et al., *Gene transfer in tilapia (Oreochromis niloticus)*. Aquaculture, 1988. **68**(3): p. 209-219.
22. Harper, G.S., et al., *Global progress toward transgenic food animals: a survey of publicly available information*. St. Lucia (Qld.): CSIRO Livestock Industries. Online verkrijgbaar van, 2003.
23. Nam, Y.K., et al., *Autotransgenic and allotransgenic manipulation of growth traits in fish for aquaculture: a review*. Journal of Fish Biology, 2008. **72**(1): p. 1-26.

24. Gong, Z., B. Ju, and H. Wan, *Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications*. *Genetica*, 2001. **111**(1-3): p. 213-225.
25. Lievens, A., et al., *Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement*. *Trends in Food Science & Technology*, 2015. **44**(2): p. 159-176.
26. Du, S.J., et al., *Growth Enhancement in Transgenic Atlantic Salmon by the Use of an [ldquo]All Fish[rdquo] Chimeric Growth Hormone Gene Construct*. *Nat Biotech*, 1992. **10**(2): p. 176-181.
27. Li, D., et al., *Rapid growth cost in "all-fish" growth hormone gene transgenic carp: Reduced critical swimming speed*. *Chinese Science Bulletin*, 2007. **52**(11): p. 1501-1506.
28. Lu, J.K., et al., *Production of transgenic silver sea bream (Sparus sarba) by different gene transfer methods*. *Mar Biotechnol (NY)*, 2002. **4**(3): p. 328-37.
29. Rahman, M.A. and N. Maclean, *Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene*. *Aquaculture*, 1999. **173**(1-4): p. 333-346.
30. Fletcher, G.L., C.L. Hew, and P.L. Davies, *Antifreeze proteins of teleost fishes*. *Annu Rev Physiol*, 2001. **63**: p. 359-90.
31. Davies, P.L. and C.L. Hew, *Biochemistry of fish antifreeze proteins*. *FASEB J*, 1990. **4**(8): p. 2460-8.
32. Nakajima-Iijima, S., et al., *Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(18): p. 6133-7.
33. Alves-Costa, F.A., M.D. Silva, and A.P. Wasko, *Characterization of alpha-actin isoforms in white and red skeletal muscle types of Leporinus macrocephalus (Characiformes, Anostomidae)*. *An Acad Bras Cienc*, 2015. **87**(4): p. 2055-66.
34. Barman, H.K., et al., *The beta-actin gene promoter of rohu carp (Labeo rohita) drives reporter gene expressions in transgenic rohu and various cell lines, including spermatogonial stem cells*. *Cell Mol Biol Lett*, 2015. **20**(2): p. 237-47.
35. Bunnell, T.M., et al., *beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(21): p. 4047-58.
36. Jin, D., R. Petters, and K. Im, *Transgenic Livestock-Review*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 1994. **7**(1): p. 1-17.
37. Thayanythy, V., et al., *Growth enhancement and food conversion efficiency of transgenic fish Labeo rohita*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 2004. **301**(6): p. 477-90.
38. Moav, B., et al., *Genetics in Aquaculture V Proceedings of the Fifth International Symposium on Genetics in Aquaculture/Inheritance of recombinant carp beta-actin/GH cDNA gene in transgenic carp*. *Aquaculture*, 1995. **137**(1): p. 179-185.
39. Hinits, Y. and B. Moav, *Growth performance studies in transgenic Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 1999. **173**(1): p. 285-296.
40. Agellon, L.B. and T.T. Chen, *Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in Escherichia coli*. *DNA*, 1986. **5**(6): p. 463-71.
41. Reinecke, M., et al., *Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go*. *Gen Comp Endocrinol*, 2005. **142**(1-2): p. 20-4.
42. Björnsson, B.T., *The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997. **17**(1): p. 9-24.
43. Waltz, E., *GM salmon declared fit for dinner plates*. *Nat Biotech*, 2016. **34**(1): p. 7-9.
44. Fox, J.L., *Transgenic salmon inches toward finish line*. *Nat Biotech*, 2010. **28**(11): p. 1141-1142.
45. Van Eenennaam, A.L. and W.M. Muir, *Transgenic salmon: a final leap to the grocery shelf?* *Nat Biotech*, 2011. **29**(8): p. 706-710.
46. Forte, V.T., et al., *A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize*. *Food Control*, 2005. **16**(6): p. 535-539.
47. Chaouachi, M., et al., *A high-throughput multiplex method adapted for GMO detection*. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(24): p. 11596-606.

48. Lynch, D. and D. Vogel, *The regulation of GMOs in Europe and the United States: A case-study of contemporary European regulatory politics*. Council on Foreign Relations, 2001.
49. Wang, C., et al., *GMO detection in food and feed through screening by visual loop-mediated isothermal amplification assays*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**(16): p. 4829-34.
50. Dorries, H.H., et al., *Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs)*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **396**(6): p. 2043-54.
51. Barbau-Piednoir, E., et al., *Inter-laboratory Testing of GMO Detection by Combinatory SYBR®Green PCR Screening (CoSYPS)*. *Food Analytical Methods*, 2014. **7**(8): p. 1719-1728.
52. Debode, F., E. Janssen, and G. Berben, *Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7)*. *European Food Research and Technology*, 2013. **236**(4): p. 659-669.
53. Hafsa, A.B., et al., *A new specific reference gene based on growth hormone gene (GH1) used for detection and relative quantification of Aquadvantage® GM salmon (Salmo salar L.) in food products*. *Food chemistry*, 2016. **190**: p. 1040-1045.
54. Kwon Nam, Y., et al., *A Rapid and Simple PCR-based Method for Analysis of Transgenic Fish using a Restricted Amount of Fin Tissue*. *Transgenic Research*, 2003. **12**(4): p. 523-525.
55. Masri, S., et al., *Detection of genetically modified coho salmon using polymerase chain reaction (PCR) amplification*. *J Agric Food Chem*, 2002. **50**(11): p. 3161-4.
56. Sin, F.Y., *Transgenic fish*. *Reviews in fish biology and fisheries*, 1997. **7**(4): p. 417-441.
57. James, D., et al., *Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis*. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(20): p. 5829-34.
58. Germini, A., et al., *Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods*. *J Agric Food Chem*, 2004. **52**(11): p. 3275-80.
59. Huber, I., et al., *Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**(43): p. 10293-301.
60. Michelini, E., et al., *New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update*. *Anal Bioanal Chem*, 2008. **392**(3): p. 355-67.
61. Markoulatos, P., N. Siafakas, and M. Moncany, *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach*. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2002. **16**(1): p. 47-51.
62. Bahrtdt, C., et al., *Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **396**(6): p. 2103-12.
63. Maclean, N. and R.J. Laight, *Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks*. *Fish and Fisheries*, 2000. **1**(2): p. 146-172.
64. Feng, H., et al., *Cloning of Black Carp β -actin Gene and Primarily Detecting the Function of Its Promoter Region*. *Acta Genetica Sinica*, 2006. **33**(2): p. 133-140.
65. Gong, Z., C.L. Hew, and J.R. Vielkind, *Functional analysis and temporal expression of promoter regions from fish antifreeze protein genes in transgenic Japanese medaka embryos*. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1991. **1**(1): p. 64-72.
66. Wu, G., Y. Sun, and Z. Zhu, *Growth hormone gene transfer in common carp*. *Aquatic Living Resources*, 2003. **16**(5): p. 416-420.

67. Devlin, R.H., et al., *Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995. **52**(7): p. 1376-1384.
68. Gross, M.L., et al., *Molecular analysis and growth evaluation of northern pike (Esox lucius) microinjected with growth hormone genes*. Aquaculture, 1992. **103**(3): p. 253-273.
69. Cheng, C.-A., et al., *Growth promotion in Ayu (Plecoglossus altivelis) by gene transfer of the rainbow trout growth hormone gene*. ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPÉI, 2002. **41**(3): p. 303-310.
70. Du, S.J., et al., *Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(2): p. 176-81.
71. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1792-7.
72. Vallone, P.M. and J.M. Butler, *AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures*. Biotechniques, 2004. **37**(2): p. 226-31.
73. Elnifro, E.M., et al., *Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology*. Clinical microbiology reviews, 2000. **13**(4): p. 559-570.
74. Vallone, P.M. and J.M. Butler, *AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures*. Biotechniques, 2004. **37**(2): p. 226-231.
75. Gaudron, T., et al., *Development of a quadruplex-real-time-PCR for screening food for genetically modified organisms*. European Food Research and Technology, 2009. **229**(2): p. 295-305.
76. Du, S.J., et al., *Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct*. Nature Biotechnology, 1992. **10**(2): p. 176-181.
77. Lu, J.-K., et al., *Production of transgenic silver sea bream (Sparus sarba) by different gene transfer methods*. Marine biotechnology, 2002. **4**(3): p. 328-337.
78. Masri, S., et al., *Detection of genetically modified coho salmon using polymerase chain reaction (PCR) amplification*. Journal of agricultural and food chemistry, 2002. **50**(11): p. 3161-3164.
79. Rahman, M.A., et al., *Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (Oreochromis niloticus)*. Transgenic research, 1998. **7**(5): p. 357-370.
80. Evans, E.A. and F.H. Ballen, *A Synopsis of US Consumer Perception of Genetically Modified (Biotech) Crops*. IFAS Extension, 2013.