

# Análise Genética dos Pigmentos Visuais e do Albinismo em *Tapirus terrestris*

Matsuchita, L. O.<sup>1</sup>; Bonci, D. M. O.<sup>2</sup>

Universidade de São Paulo, Instituto de Psicologia

1. [matsuchita@usp.br](mailto:matsuchita@usp.br); 2. [dbonci@usp.br](mailto:dbonci@usp.br)

Esta pesquisa se propõe a estudar a genética do albinismo presente em um filhote fêmea de anta-brasileira (*Tapirus terrestris*) e a genética de visão de cores da mesma espécie. Para a maioria dos mamíferos não-primatas, a visão de cores é dicromata e determinada pelas classes de pigmentos visuais LWS (maximamente sensível a comprimentos de onda longos) e SWS1 (maximamente sensível a comprimentos de onda curtos). Estes pigmentos são compostos por uma proteína opsina e um cromóforo 11-cis-retinal (Yokoyama, 2000). O pico de absorção espectral ( $\lambda_{\max}$ ) de fotopigmentos é determinado pela interação entre aminoácidos em sítios específicos e o cromóforo. Para o pigmento LWS os sítios importantes para o ajuste espectral são 180, 197, 277, 285 e 308, e para o pigmento SWS1 os sítios 46, 52, 86, 114 e 118 são os mais importantes (Yokoyama, 2000; Yokoyama & Radlwimmer, 1998). Mutações presentes no gene da tirosinase (TYR) são as principais responsáveis pela perda de pigmentação característica do albinismo, as quais podem resultar em uma enzima defeituosa incapaz de produzir a melanina ou que a produz em taxas reduzidas e prejudica o processo de conversão do aminoácido tirosina em melanina, causando o albinismo (Jauregui, Huryn & Brooks, 2018).

## OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são: estimar os picos de sensibilidade espectral das opsinas de anta-brasileira e comparar com diferentes espécies de mamíferos; e determinar a causa genética do albinismo na anta.

## MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA (nº 4515181220, ID 000265) e SISBIO (nº de processo 77193). Doze amostras de sangue de nove indivíduos foram coletadas no Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros para posterior extração de DNA utilizando o kit e protocolo PUREGENE DNA Purification (Gentra Systems, QIAGEN). A técnica de PCR foi realizada com o kit Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies) para a amplificação dos éxons 3 e 5 do gene LWS,

éxon 1 do gene SWS1 e éxon 1 do gene TYR. Foi feita eletroforese em gel de agarose (2%) e a purificação do produto de PCR com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band purification (GE Healthcare). Foram realizados sequenciamentos no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE), em São Paulo, e no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco (Genoma) do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. No IIEPAE, o sequenciamento foi realizado com a utilização do kit Big Dye Terminator (Life Technologies) e sequenciador 3500xL (Life Technologies). No Genoma, foram utilizados o kit Big Dye Terminator (Life Technologies) e o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies). As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa BioEdit v7.2.5 e comparadas com sequências dos genes LWS e SWS1 de opsinas e gene TYR de outras espécies disponíveis no GenBank.

## RESULTADOS

**Éxon 3 de LWS (Imagem 1).** Alinhando as sequências de LWS de cavalo (*Equus caballus*, AF132043.1) e as sequências das anta-brasileiras, localizamos no sítio 180 a substituição de alanina por serina nas sequências de antas, o que indicaria um deslocamento de  $\lambda_{\max}$  em direção ao vermelho em 7nm, o que indica uma maior sensibilidade a comprimentos de onda mais longos.

**Éxon 5 de LWS.** Os resultados do sequenciamento não se alinharam adequadamente à sequência referência de cavalo. Além disso, a ferramenta Nucleotide BLAST do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que identifica sequências semelhantes em sua base de dados, não apontou semelhanças com nenhuma sequência de opsina. Em função disso, foram desenhados novos primers, ainda localizados na região de íntron, mas com menor distância do éxon 5 de LWS.

**Éxon 1 de SWS1 (Imagem 2).** Foi realizado um alinhamento da sequência consenso de antas com a rodopsina bovina (NM\_001014890.2) e a sequência de SWS1 de rato (*Rattus norvegicus*,

NM\_031015.2) como exemplo de animal com pigmento sensível a ondas ultravioletas, determinado por F46, T52, F86, A114, S118. A anta-brasileira não possui nenhum dos aminoácidos nos sítios específicos que indicariam uma visão sensível a ondas ultravioletas.

**Primeira metade do éxon 1 de TYR.** Ao alinhar as sequências de cavalo (XM\_001492560.4), anta não albina (A4) e anta albina (A5), encontramos algumas trocas de bases, mas que não resultam na tradução de aminoácidos diferentes. Em 126 e 234, o sequenciamento de A4 indica R (ambiguidade entre A e G), mas em ambos os casos, o aminoácido codificado, fosse a base A ou G, era o mesmo, sendo prolina no códon contendo 126 e leucina no códon contendo 234. Em 417, tanto o cavalo quanto a anta não albina possuem uma timina, enquanto a anta albina possui uma citosina. Ao realizar a

tradução, nota-se que, no cavalo, na anta albina e na anta não albina, o códon codifica o aminoácido leucina.

**Segunda metade do éxon 1 de TYR.** Os resultados do sequenciamento não se alinharam adequadamente à sequência referência de cavalo e o Nucleotide BLAST não apontou semelhanças com sequências de tirosinase. Foi possível alinhar o primer forward da segunda metade do éxon 1 de TYR e as sequências obtidas da primeira metade do éxon. Concluímos que os primers reversos não eram adequados e desenhamos novos primers: um primer reverso que está localizado dentro do éxon 1, o que resultaria em um sequenciamento parcial do éxon 1 mas garantiria que a região correta seja amplificada e outro na região de íntron, o que permitiria o sequenciamento integral do éxon 1.

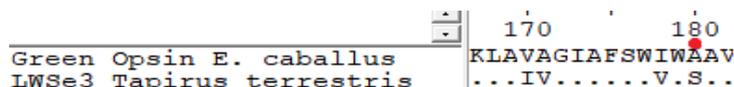


Imagem 1. Alinhamento dos aminoácidos que compõem uma pequena sequência da opsina LWS de cavalo (AF132043.1) com fragmento da sequência do gene LWS de anta-brasileira e sítio específico 180 indicados em vermelho. Os pontos em preto na sequência de anta-brasileira indicam que o aminoácido neste sítio é o mesmo aminoácido presente na sequência referência (do cavalo neste caso).

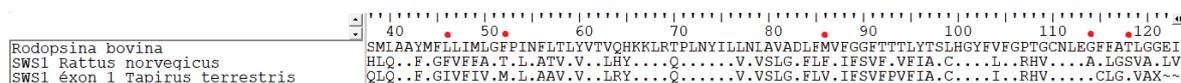


Imagem 2. Alinhamento dos aminoácidos que compõem rodopsina bovina, SWS1 de rato e o éxon 1 de SWS1 de anta-brasileira, com sítios específicos (46, 52, 86, 114 e 118) marcados em vermelho. O ponto em preto na sequência de anta-brasileira indica que o aminoácido neste sítio é o mesmo aminoácido presente na sequência referência, sendo a sequência de rodopsina bovina neste caso.

## CONCLUSÕES PARCIAIS

**LWS.** A substituição A180S desloca  $\lambda_{max}$  7nm em direção ao vermelho. Mais PCRs e sequenciamentos com os novos primers do éxon 5 devem ser realizados para identificar os aminoácidos presentes nos sítios específicos restantes.

**SWS1.** Concluímos que  $\lambda_{max}$  da anta brasileira não se encontra nas faixas que indicariam visão de cores sensível a ondas ultravioletas, sendo provavelmente, o pico de absorção espectral do pigmento SWS1 na região do violeta.

**TYR.** A mutação responsável pelo albinismo na anta-brasileira não se encontra na primeira metade do éxon 1 do gene TYR. Provavelmente, a mutação se encontra na segunda metade do éxon 1. Mais PCRs e sequenciamentos - tanto da primeira quanto da segunda metade do éxon

1 - com amostras de mais animais devem ser realizados para identificar a mutação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jauregui, R., Huryn, L. A., & Brooks, B. P. (2018). Comprehensive Review of the Genetics of Albinism. *Journal of Visual Impairment & Blindness*, 112(6), 683-700.
- Yokoyama, S. (2000). Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Progress in retinal and eye research*, 19(4), 385-419.
- Yokoyama, S., & Radlwimmer, F. B. (1998). The " five-sites" rule and the evolution of red and green color vision in mammals. *Molecular biology and evolution*, 15(5), 560-567.

A pesquisa conta com bolsa PIBIC (CNPq) e a professora orientadora é associada ao projeto Temático FAPESP nº 2014/26818-2.