

IX ACÇÃO DE TRANSFERÊNCIA

Potencial de aplicação de ferramentas moleculares na
investigação em aquacultura

Cofinanciado por:

Potencial de aplicação de ferramentas moleculares na investigação em aquacultura

As ferramentas de biologia molecular podem ser instrumentos bastante úteis para avaliação das condições de saúde e bem-estar de espécies produzidas em aquacultura. Este tipo de metodologia molecular está, cada vez mais, a ser utilizado na determinação da contribuição parental das várias espécies produzidas, na determinação da variação genética entre populações selvagens e cultivadas, na identificação de genes envolvidos em características com importância económica (ex. crescimento, resistência a doenças, etc.), desenvolvimento de bio-marcadores que possam funcionar como sinalizadores de uma determinada condição de bem-estar, entre outros.

Nesta ação de interação e transferência de conhecimento serão disponibilizados conteúdos sobre o potencial da aplicação destas ferramentas na aquacultura.

IX ACÇÃO DE INTERACÇÃO - 22 de outubro de 2019

O potencial das ferramentas moleculares em aquacultura

Local: EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

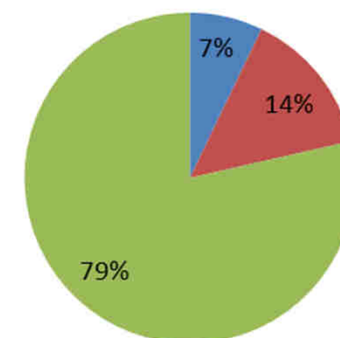
Horário	Programa
14:15 – 14:30	Recepção dos participantes
14:30 – 15:00	Ferramentas moleculares – O que são? <i>Cátia Marques e Ana Catarina Matias</i>
15:00 - 15:30	Ferramentas moleculares baseadas no DNA: aplicabilidade em aquacultura <i>Cátia Marques</i>
15:30 – 16:00	Análise de proteínas e sua aplicabilidade em aquacultura <i>Ana Catarina Matias</i>
16:00 – 16:15	Intervalo para café
16:15 – 17:00	Prática: Como recolher e armazenar tecidos para análises moleculares <i>Cátia Marques, Catarina Marques e Ana Catarina Matias</i>



Total participantes acção: 14

Área actividade participantes

■ Outros ■ Empresa/sector ■ Investigação



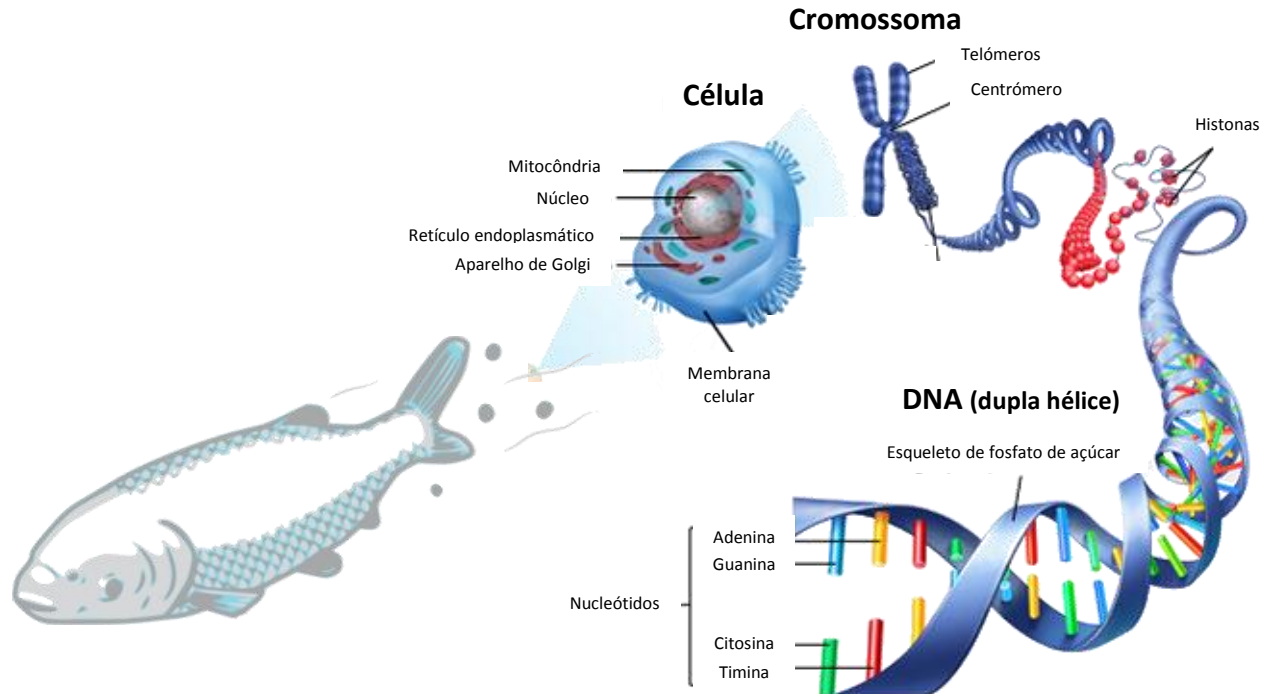
Ferramentas moleculares: o que são?



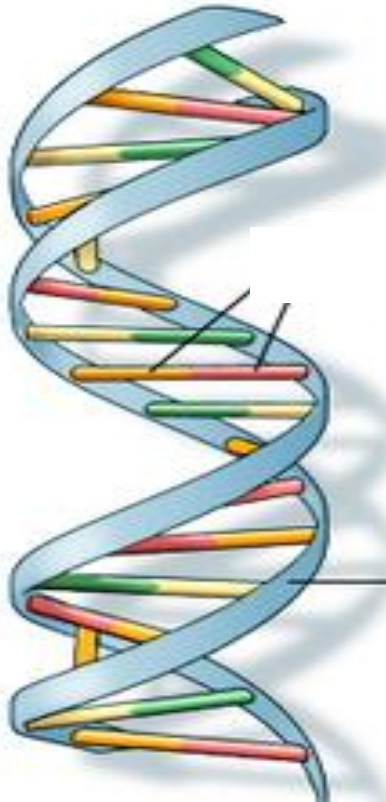
19 de junho de 2019

Cátia Marques (catia.marques@ipma.pt) e Ana Catarina Matias (ana.matias@ipma)

Do organismo ao DNA



O que é o DNA?



Existe nas células de todos os organismos



Responsável pelas características hereditárias

É composto por 4 bases (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) que emparelham entre si



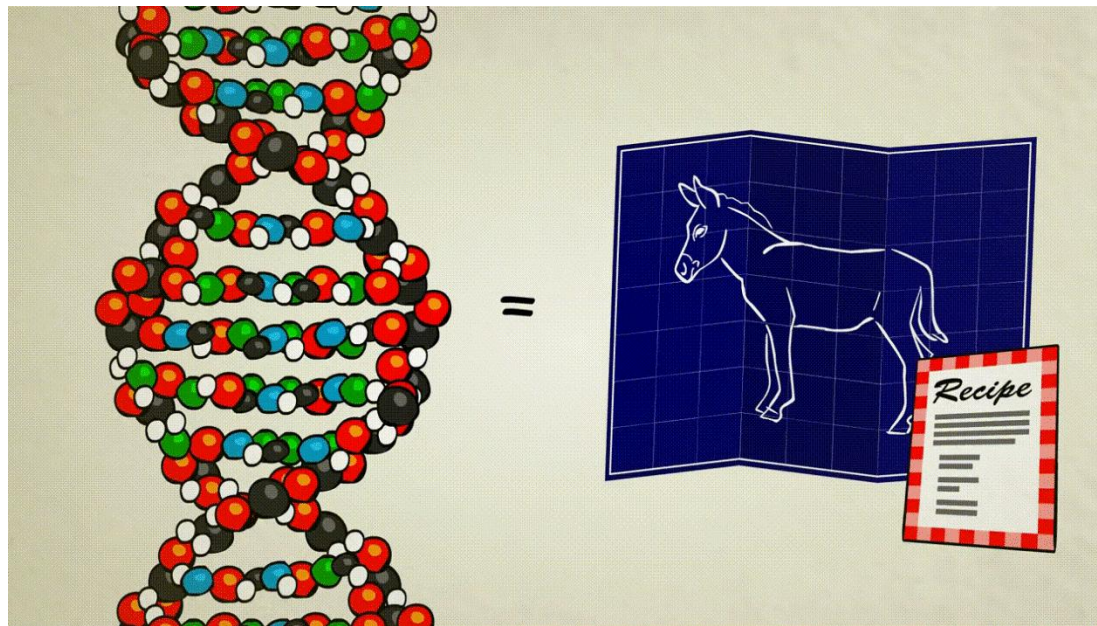
Adenina Timina



Guanina Citosina

Como funciona?

Funciona como um disco rígido onde é armazenada informação essencial ao funcionamento de um organismo



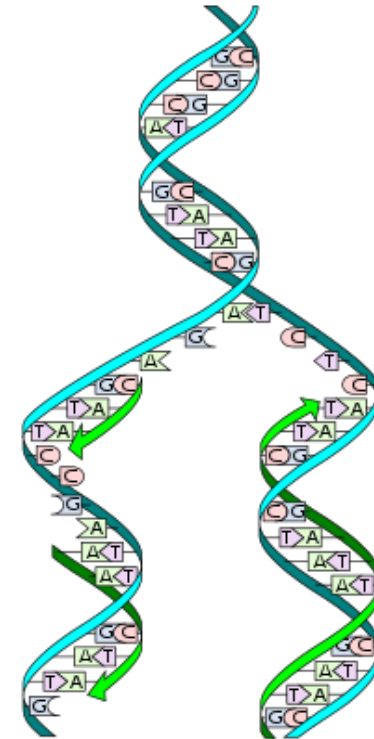
A replicação

É o processo que as células utilizam para se dividir

A molécula original (mãe) é copiada e origina duas moléculas idênticas

A velocidade de replicação depende do tipo de células:

- Replicação constante (cabelo, unhas)
- Replicação em resposta a estímulo (pele, fígado)
- Replicação inicial seguida de “stand-by” (cerebro, musculo, coração)



A transcrição

Os segmentos de DNA que contêm informação genética chamam-se genes;

Os genes contêm informação que permite, através da leitura do código genético, fabricar as proteínas;

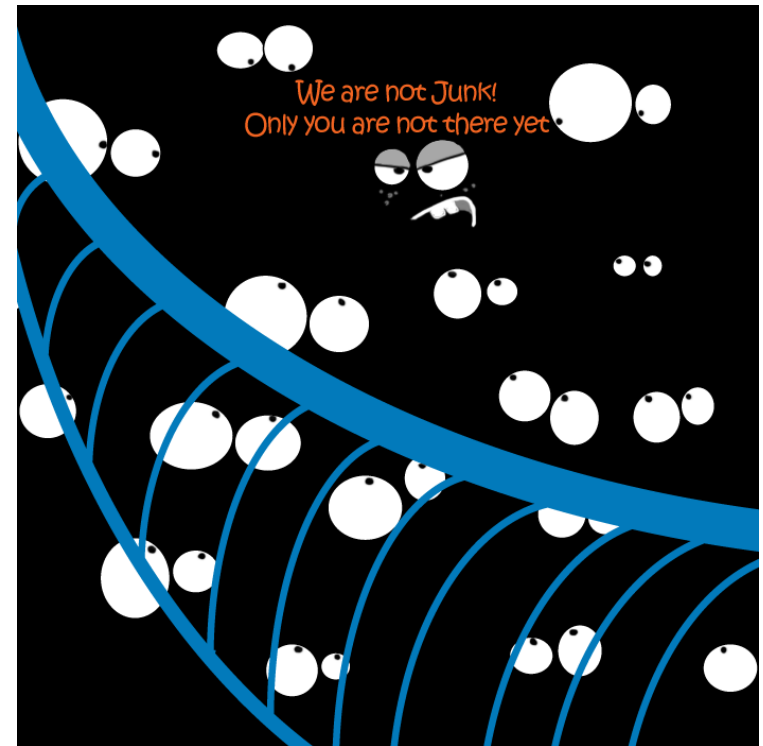
Para ler essa informação as células transformam a molécula de DNA em RNA;



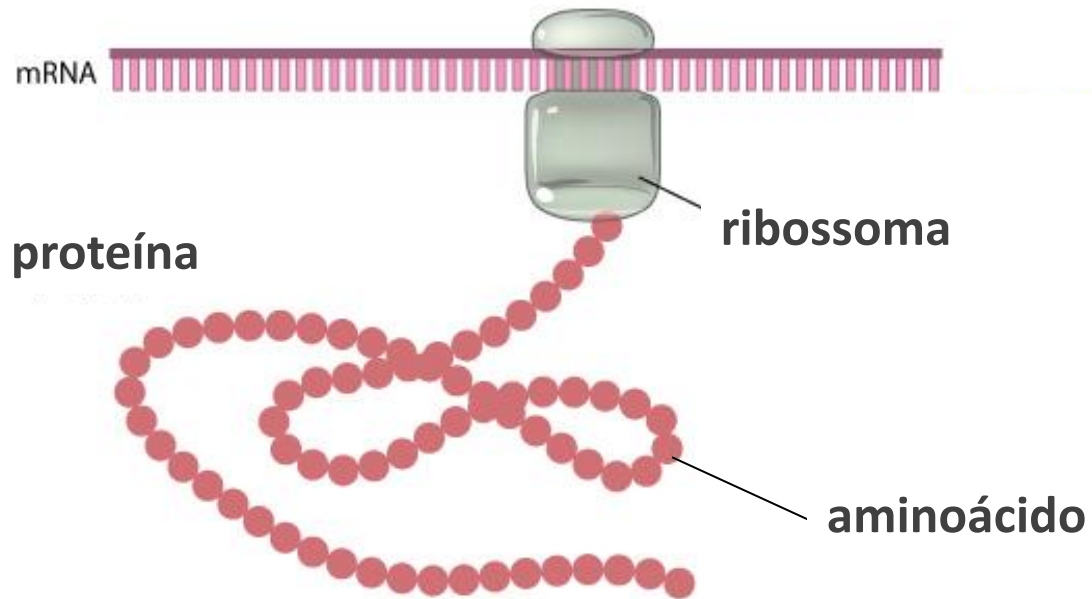
O “junk-DNA”

O RNA é depois utilizado para produzir proteínas;

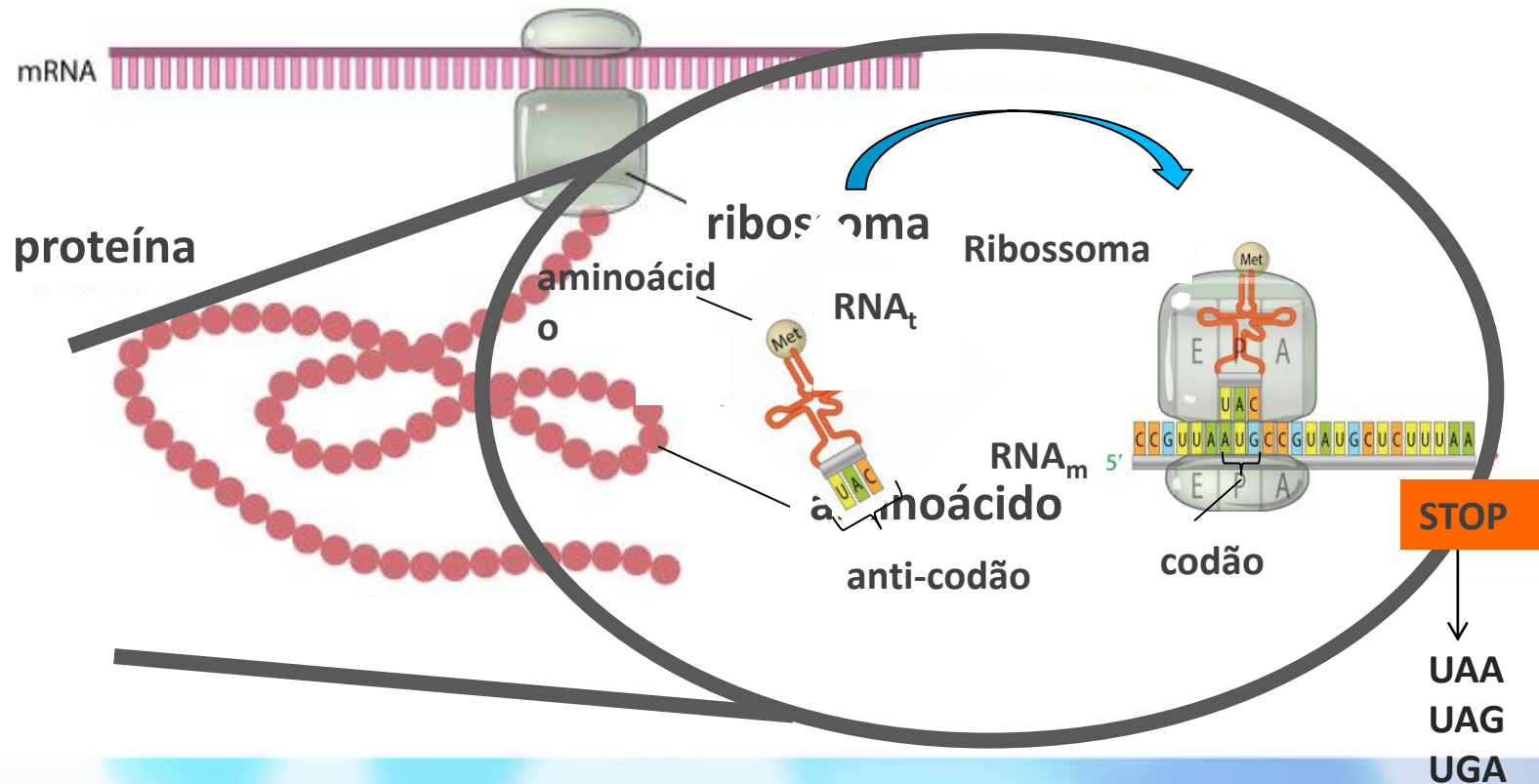
Os genes são apenas 3% do DNA de um organismo. Os restantes 97% são muitas vezes chamados de “junk-DNA”, mas hoje sabe-se que funcionam como regiões reguladoras.



A tradução



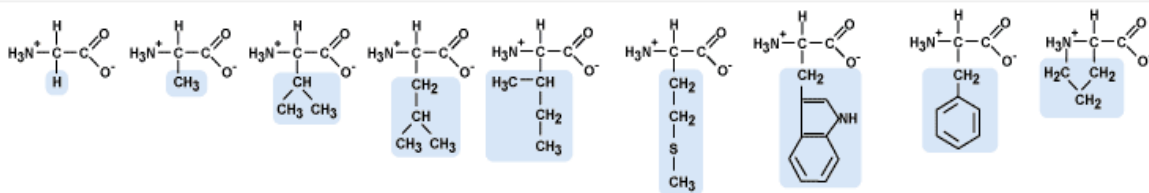
A tradução



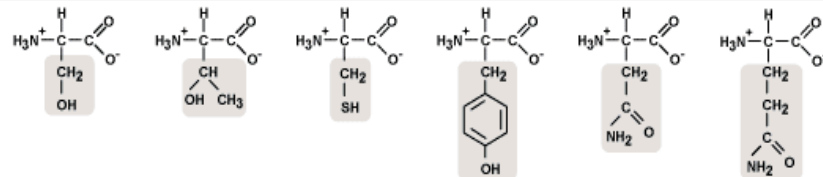
O Código genético

		Second nucleotide							
		U	C	A	G				
U	UUU	Phe	UCU		UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC	Ser	UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	STOP	UGA	STOP	A
	UUG		UCG		UAG	STOP	UGG	Trp	G
C	CUU		CCU		CAU	His	CGU		U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC		CGC	Arg	C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU		ACU		AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU		GCU		GAU	Asp	GGU		U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC		GGC	Gly	C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

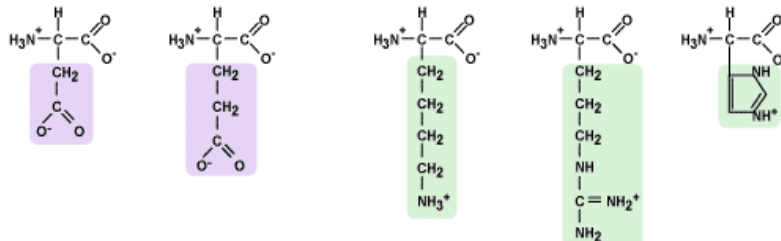
Os 20 Aminoácidos primários



Glycine (Gly) Alanine (Ala) Valine (Val) Leucine (Leu) Isoleucine (Ile) Methionine (Met) Tryptophan (Trp) Phenylalanine (Phe) Proline (Pro)

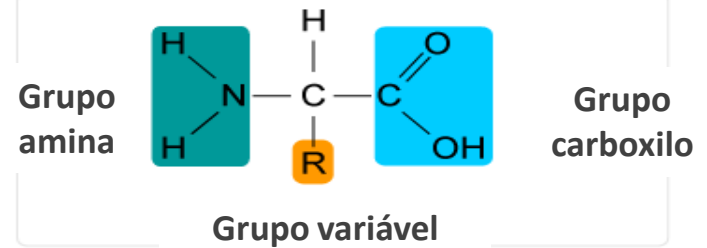


Serine (Ser) Threonine (Thr) Cysteine (Cys) Tyrosine (Tyr) Asparagine (Asn) Glutamine (Gln)



Aspartic Acid (Asp) Glutamic Acid (Glu) Lysine (Lys) Arginine (Arg) Histidine (His)

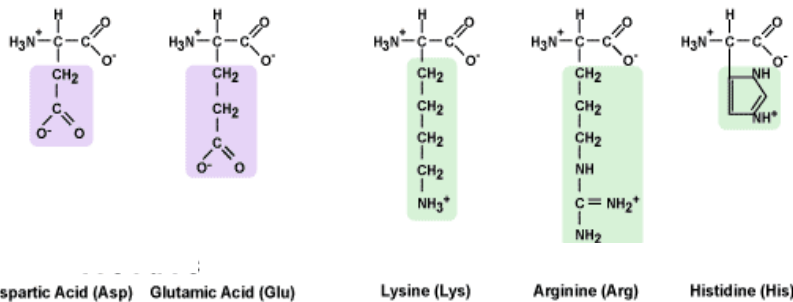
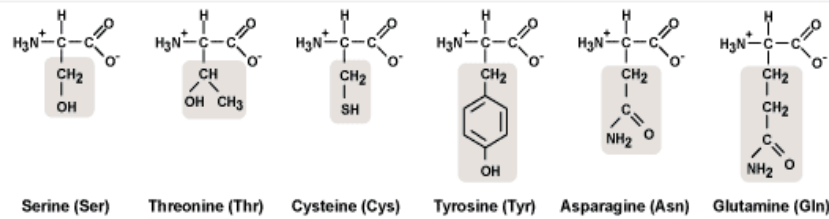
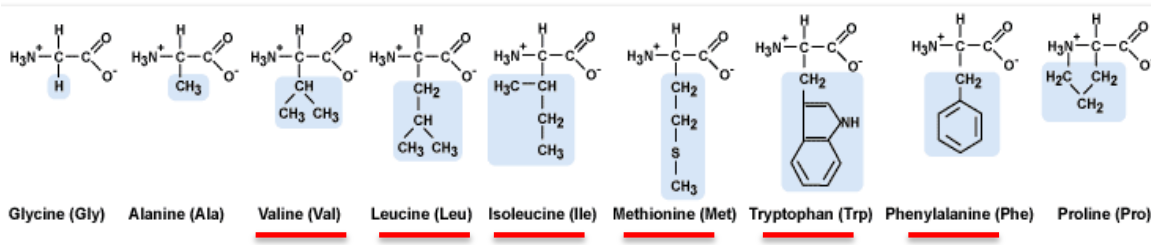
Estrutura geral de um aminoácido



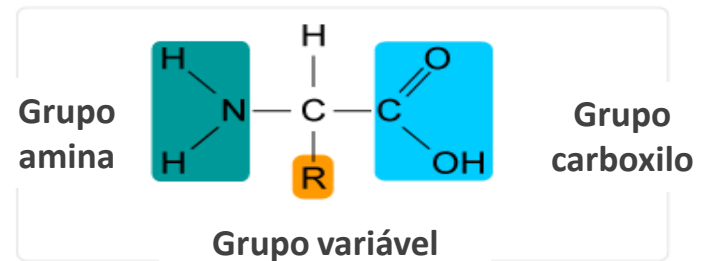
Dept. Biol. Penn State ©2002

Dept. Biol. Penn State ©2002

Os 10 Aminoácidos essenciais



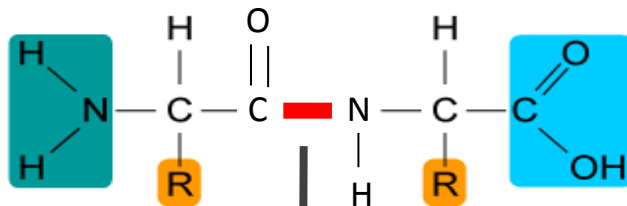
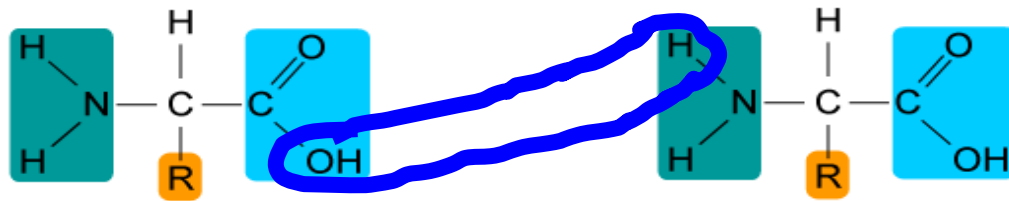
Estrutura geral de um aminoácido



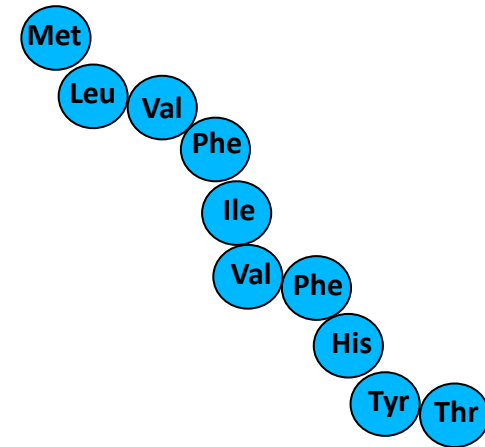
Dept. Biol. Penn State ©2002

Dept. Biol. Penn State ©2002

A ligação peptídica

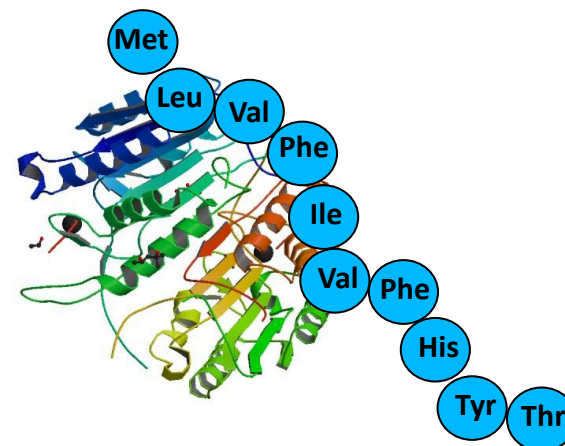


Ligação peptídica



Proteína

As Proteínas



Zebra fish caspase-3 (PDB 5JFT)

Proteína

As Proteínas

- **Desempenham todas as funções necessárias para a vida!!!**

- exemplos:
- Hemoglobina
 - Enzimas
 - Actina, miosina
 - Anticorpos
 - etc.

Resumo

- Primeira parte:**
- Como são sintetizadas as proteínas?
 - O que são?
 - Qual a sua importância?

- Segunda parte:**
- Utilização das proteínas no estudo do estado fisiológico de organismos marinhos

O que são as **ferramentas moleculares**?

São ferramentas que nos permitem trabalhar ao nível molecular;
São normalmente utilizadas em genética, bioquímica, biologia molecular, biofísica, entre outros, e permitem:

A identificação de genes envolvidos em doenças

A compreensão de mecanismos que controlam a expressão genética

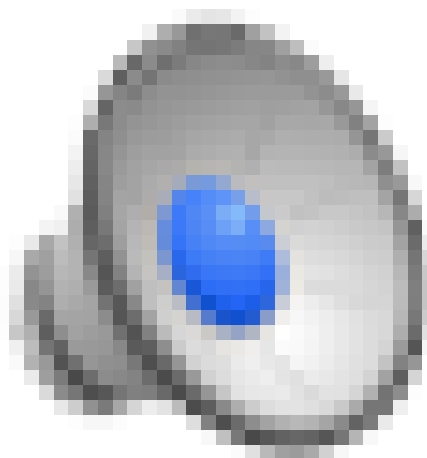
O estudo estrutural e funcional de proteínas

Identificação de marcadores do estado fisiológico

Identificação de micro-organismos

Terapia genética para o tratamento de doenças

Vídeo resumo



Análise de proteínas e sua aplicabilidade em aquacultura

Proteínas: biomarcadores



- Oscilações de temperatura
- Má nutrição
- Doença
- Exposição a toxinas, etc.



Argyrosomus regius

20 DAH

230 DAH

Processo bem regulado e em equilíbrio



Afeta proteínas envolvidas nos processos celulares



Biomarcadores estado fisiológico

Proteínas: biomarcadores

Hsp70 – ajudam as proteínas a adquirir a sua estrutura; impedem que percam a sua estrutura funcional



- Densidade
- oscilações de temperatura
- Nutrição

Hsp70  

Western blot

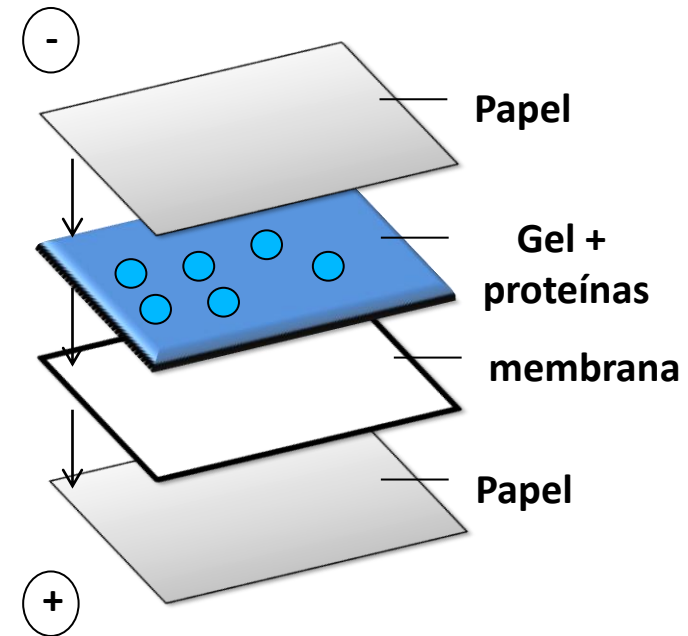
1. Preparação das amostras



2. Separação das proteínas (electroforese)

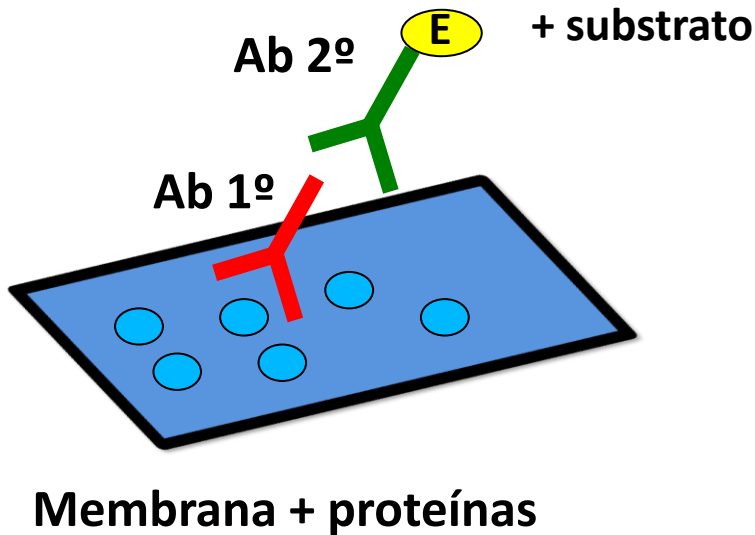


3. Transferência

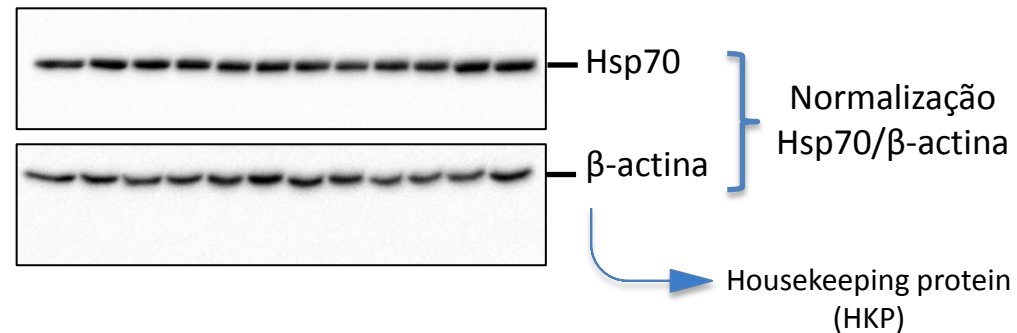


Western blot

4. Lavagens e incubação com anticorpos

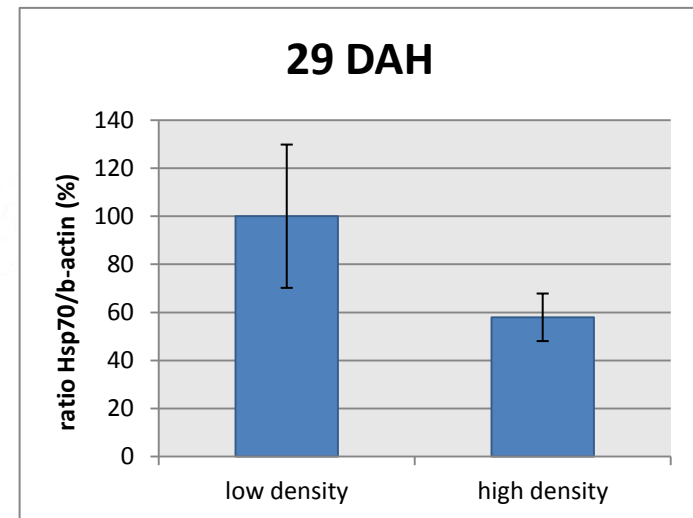
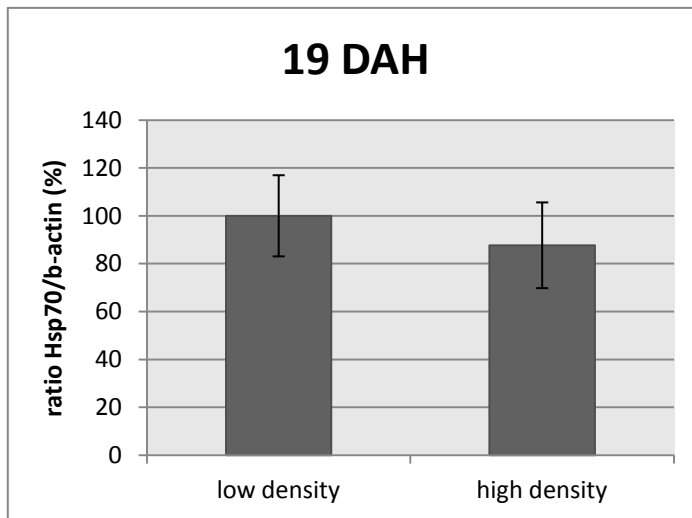


5. Aquisição de imagem e quantificação

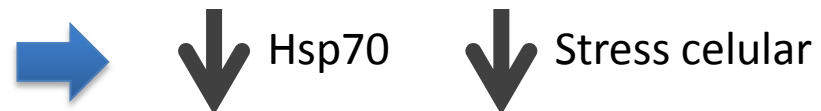


Hsp70: densidade

- Avaliar que densidade de cultivo poderia causar menos stress celular em larvas de corvina

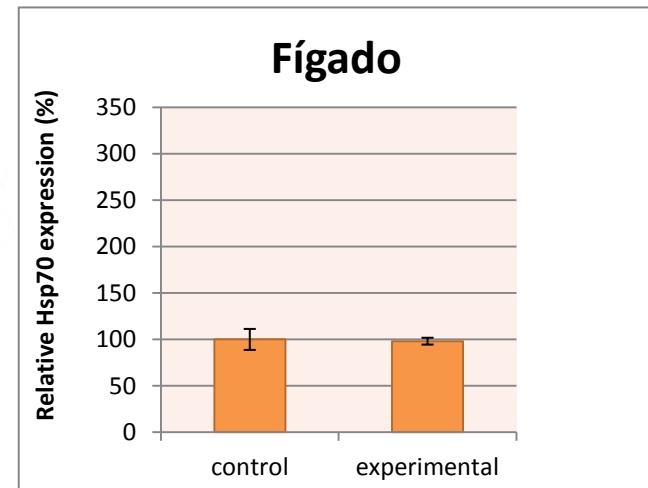
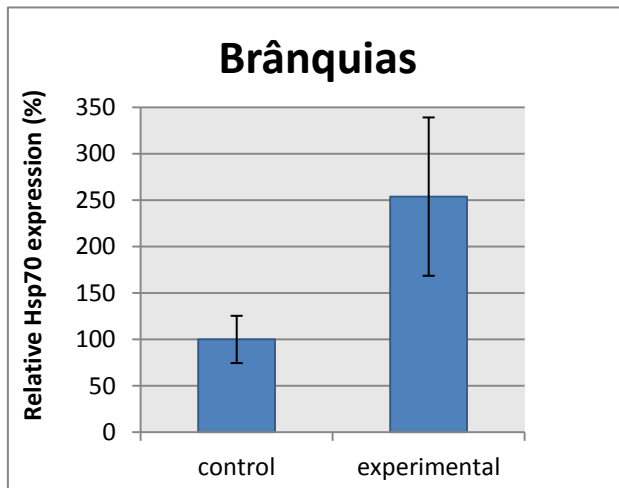


baixa densidade – 25 larvas/L
 elevada densidade – 50 larvas/L



Hsp70: oscilações de temperatura

- Avaliar o impacto de oscilações de temperatura em dourada

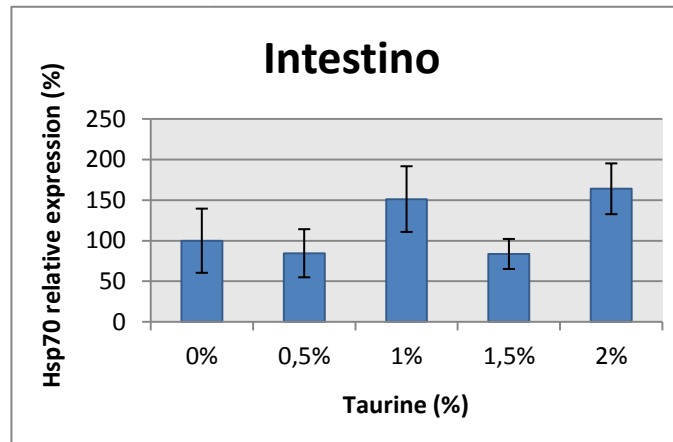
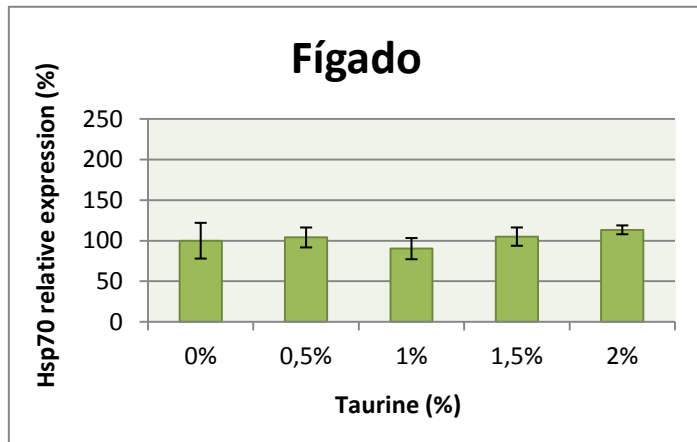


↑ Hsp70

↑ Stress celular

Hsp70: nutrição

- Avaliar efeito modulador da taurina nos sistemas de degradação de proteínas em corvinas alimentadas com uma dieta rica em ingredientes vegetais



↑ Hsp70
 ↑ síntese e degradação proteica

Resumo

- Proteínas podem ser utilizadas para caracterizar determinados estados fisiológicos de organismos marinhos, como por exemplo stress ou boa/má nutrição
- Hsp70 é um exemplo desses marcadores
- Técnica de *western blot* pode ser utilizada para análise de proteínas em organismos marinhos