

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacológicas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Estudo de genes de referência em Zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos
superexpressando o hormônio do crescimento**

Gabriela Terra Rassier

Pelotas, 2019

Gabriela Terra Rassier

**Estudo de genes de referência em Zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos
superexpressando o hormônio do crescimento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Coorientador: Dr. Tony Leandro Rezende da Silveira

Pelotas, 2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Tony Leandro Rezende da Silveira (FURG, ICB)

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (FURG, ICB)

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos (Orientador, UFPel, PPGB)

Dedico este trabalho, bem como todas as minhas conquistas, à minha filha, Manuela e à minha mãe, Tania (*in memoriam*).

Agradecimentos

Ao meu orientador, Vinicius Farias Campos pelo qual tenho profunda admiração. Obrigada pela oportunidade, pela amizade e por não ser apenas um excelente profissional, mas ser também, um grande ser humano, que serve de inspiração não só pra mim como pra muita gente.

À equipe do Genstrut por todo o apoio e disponibilidade em auxiliar durante o mestrado, por dividir experiências, trocar conhecimento, pelas boas risadas e principalmente, pela amizade construída!

Aos ICs pela dedicação ao meu trabalho, ao Edu querido que sempre esteve disposto a ajudar.

Às minhas mimosas, Amanda e Larissa. “Minhas filhas” como eu brincava. Vocês foram duas colegas que se tornaram grandes amigas, que deixaram meus dias bem melhores e que também, contribuíram de forma muito significativa pra este trabalho. Gurias, nossa amizade vai muito além do dia a dia de um laboratório e com toda certeza, será pra sempre!

À Eliza, que contribuiu de forma fundamental neste trabalho, mesmo com a correria nas últimas semanas, sempre esteve prestativa e me mostrou com pouco tempo de convívio o porquê ela é tão querida por todos.

Ao Tony pela grande contribuição desde a coleta e pela forma interessada que acompanhou as análises para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial, às minhas irmãs Wanessa e Alessandra. Wanessa, obrigada por contribuir tanto nos meus dias (mesmo de tão longe), com cada palavra de apoio e de incentivo. Sou grata e abençoada por ser minha irmã.

À minha filha Manuela, minha vida, meu grande amor... que tanto teve que abrir mão de passeios e finais de semana em razão dos meus estudos, que desde muito pequenininha já me dizia: “Vai dar certo mamãe, vou rezar por ti!”

Aos meus amigos por torcerem junto e por principalmente, entenderem a minha ausência e a falta de tempo pra um simples mate e por negar infinitos convites com a mesma justificativa... “tenho que estudar!”

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES por conceder a bolsa de mestrado acadêmico durante este período.

E, por fim, a todos que colaboraram de alguma forma, muito obrigada!!!

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo” (Albert Einstein).

Resumo

RASSIER, Gabriela. **Estudo de genes de referência em Zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos superexpressando o hormônio do crescimento**. 2019. 58f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A PCR quantitativa em tempo real é uma das mais importantes técnicas na análise da expressão gênica e tem como pré-requisito o uso de genes de referência. Esses genes têm por função, normalizar os dados da reação, possuindo papel importante no desfecho dos resultados e sucesso da análise. Os genes de referência devem possuir expressão significativa e estável nos tecidos em todas as condições experimentais. Para o modelo animal zebrafish (*Danio rerio*) esses genes vêm sendo estudados, entretanto para os modelos transgênicos dessa espécie até onde sabemos, não há estudos neste sentido. O zebrafish gh-transgênico faz parte de uma linhagem denominada F0104, desenvolvida com o hormônio do crescimento oriundo do peixe-rei marinho (*Odonthestes argentinensis*). Pressupondo-se que o processo de transgenia possa influenciar os níveis de expressão de genes comumente utilizados como normalizadores, levando à necessidade de se validar genes de referência específicos para estudos de expressão gênica em zebrafish transgênicos. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a estabilidade dos genes *actb1*, *actb2*, *atp1a*, *b2m*, *eif2b*, *ef1α*, *igf1*, *gapdh*, *rpl2*, *rpl7*, *rpl13α*, *tuba*, e *18s* em diferentes tecidos de zebrafish transgênicos e não transgênicos, a fim de avaliar o seu potencial uso como genes de referência. Para tal, animais adultos, de ambos os sexos, gh-transgênicos (n=21) e não transgênicos (n=21), constituíram os grupos experimentais. Amostras de fígado, cérebro, intestino e musculatura foram coletadas. A cada três amostras de cada órgão coletado, um pool foi confeccionado, totalizando sete pools. Após as etapas de extração de RNA, síntese de cDNA e real-time qPCR, foram realizadas as análises com os softwares dCt, GeNorm, NormFinder, BestKeeper e RefFinder. Os resultados demonstraram que independentemente do tipo de tecido coletado, os genes mais estáveis para o grupo gh-transgênico, foram *rpl13α*, *ef1α*, *rpl7* e *rpl2*, enquanto os menos estáveis foram os genes *gapdh*, *18s* e *tuba*. A partir dos dados obtidos, verificou-se, que o tecido que mais influenciou na instabilidade dos genes foram o intestino e o fígado entre os grupos analisados. Este estudo evidenciou ainda, que mesmo genes considerados constitutivos e comumente utilizados como normalizadores em estudos feitos com zebrafish selvagem, tais como *gapdh*, *18s* e *tuba*, sofreram variações entre os diferentes tecidos, tanto de animais transgênicos quanto em não transgênicos. Por fim, conclui-se que os genes *rpl13α*, *ef1α*, *rpl7* e *rpl2* possuem alta estabilidade, sendo possível sua utilização como genes de referência em estudos envolvendo análise de expressão gênica em zebrafish (*Danio rerio*) gh-transgênicos e que claramente, os genes como *gapdh*, *18s* e *tuba* possuem baixa estabilidade e, portanto, não são adequados como genes de referência para os grupos e tecidos estudados.

Palavras-chave: Normalizadores; RT-qPCR; housekeeping genes; níveis de transcritos; expressão gênica.

Abstract (corrigir o ingles)

RASSIER, Gabriela. **Study of reference genes for transgenic Zebrafish (*Danio rerio*) overexpressing growth hormone**. 2019. 58f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Real-time quantitative PCR is one of the most important techniques in the analysis of gene expression and needs the use of reference genes. These genes have the function of normalizing the reaction data, having an important role in the outcome and success of the analysis. Reference genes must have significant and stable expression in tissues and in all experimental conditions. Zebrafish (*Danio rerio*) reference genes have been studied, however, as far as we know, there are no studies for the transgenic models of this species. The gh-transgenic zebrafish is a strain called F0104, developed to overexpress the growth hormone from silverside (*Odontheistes argentinensis*). It is assumed that the transgenic process may influence the expression levels of commonly used reference genes, leading to the need to validate specific reference genes for gene expression studies in transgenic zebrafish. In this context, the objective of the present study was to analyze the stability of genes *actb1*, *actb2*, *atp1a*, *b2m*, *ef1a*, *ef1b*, *ef1c*, *igf1*, *gapdh*, *rpl2*, *rpl7*, *rpl13a*, *tuba*, and *18s* in transgenic and non-transgenic zebrafish, in order to evaluate their potential use as reference genes. For this, adult animals of both sexes, gh-transgenic (n = 21) and non-transgenic (n = 21), constituted the experimental groups. Liver, brain, intestine and muscle samples were collected. Every three samples of each organ collected, a pool was made, totalizing seven pools. After the steps of RNA extraction, cDNA synthesis and real-time qPCR, the analyzes were performed with software dCt, GeNorm, NormFinder, BestKeeper and RefFinder. The most stable genes for the gh-transgenic zebrafish group were *rpl13a*, *ef1a*, *rpl7* and *rpl2*, whereas the less stable genes were the *gapdh*, *18s* and *tuba* genes, respectively. From the obtained data, it was verified that the tissue that most influenced in the instability of the genes were the intestine and the liver. This study also showed that even genes considered to be constitutive and commonly used as normalizers in studies with non-transgenic zebrafish, such as *gapdh*, *18s* and *tuba*, suffered variations between different tissues of both transgenic and non-transgenic animals. Finally, it is concluded that the genes *rpl13a*, *ef1a*, *rpl7* and *rpl2* have high stability, being possible to be used as reference genes in studies involving analysis of gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) and that genes such as *gapdh*, *18s* and *tuba* have low stability and therefore are not suitable as reference genes for the studied groups and tissues.

Keywords: Normalizers; RT-qPCR; housekeeping genes; transcript levels; gene expression.

Lista abreviaturas e Siglas

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR – quantitative PCR (PCR quantitativo ou PCR em tempo real)

qRT-PCR – quantitative Reverse Transcription PCR (Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativo)

RNA – Ribonucleicacid (Ácido ribonucleico)

DNA – *Deoxyribonucleicacid*(Ácido desoxirribonucleico)

DP – Desvio padrão

Lista de Símbolos

± Mais ou menos

< Menor

> Maior

© Copyright

% Porcentagem

°C Grau Celsius

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	PCR quantitativo em tempo real.....	19
3.2	Genes de referência	20
3.3	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) transgênico como modelo biológico.....	21
4	CAPÍTULO 1.....	24
4.1	Manuscrito	24
5	CONCLUSÃO GERAL.....	53
6	REFERÊNCIAS	54
7	ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A análise de expressão gênica utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) é considerada uma técnica padrão-ouro para a medição precisa, sensível, rápida e também por sua simplicidade e velocidade de processamento (TANG et al., 2012). Essa técnica, porém, necessita do uso de genes de referência, utilizados para a normalização e leitura adequada dos dados obtidos. Os genes de referência devem apresentar estabilidade e com isso, não devem alterar sua expressão durante os estágios de desenvolvimento, tecidos ou em respostas a tratamentos experimentais (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Entretanto, a literatura tem demonstrado recentemente, que dependendo do gene de referência empregado para a normalização, os dados obtidos podem sofrer um viés de até quatro vezes na expressão de determinado gene alvo (VANHAUWAERT et al., 2016). Isso demonstra claramente que o uso de vários genes de referência validados e específicos para diferentes espécies e condições experimentais é fundamental para obter dados de expressão mais confiáveis. (ZHENG; SUN, 2011).

Dentre os modelos experimentais utilizados, o zebrafish (*Danio rerio*), um peixe tropical de água doce, vem sendo inserido na comunidade científica devido às suas inúmeras vantagens, como elevadas taxas de reprodução, baixo custo, embriões transparentes (o que possibilita a visualização da expressão de genes repórteres em linhagens transgênicas), além de outros atributos importantes da biologia desta espécie (BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014; DAI et al., 2014).

Os avanços na área da biotecnologia nas últimas décadas têm fornecido ferramentas importantes para a manipulação de genes e cromossomos em organismos vivos. O desenvolvimento de peixes transgênicos é um tema de grande interesse para a aquicultura devido ao potencial de melhoramento na produção que esta tecnologia pode oferecer (ZBIKOWSKA, 2003; DUNHAM, 2004). A Transgênese envolve alteração genômica de um organismo através da inserção, modificação ou eliminação de um gene com o objetivo de modificar características de interesse (HOUBINE, 2002; CARTER, 2004). A partir dessa técnica, características novas, estáveis e determinadas geneticamente poderão ser

incorporadas ao organismo receptor, com a possibilidade de serem transmitidas para a progênie.

A transgênese vem ganhando espaço e o crescimento animal tem sido um dos alvos mais frequentes da manipulação genética. No caso dos peixes, a técnica vem sendo utilizada não apenas com o intuito de desenvolver espécies melhoradas e mais produtivas, mas também buscando desenvolver modelos alternativos para examinar a fisiologia do crescimento (LEGATT et al., 2012). Nesse contexto, uma linhagem (F0104) de zebrafish (*Danio rerio*) geneticamente modificado, que superexpressa o gene do *gh* do peixe-rei marinho (*Odonthestes argentinensis*), foi desenvolvida e pode ser utilizada para estudos no grupo de vertebrados (FIGUEIREDO et al., 2007).

Embora haja controvérsias na aplicação da transgenia para fins de produção, recentemente a agência de controle de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (Food & Drug Administration - FDA) aprovou a produção e a liberação do salmão do Atlântico (*Salmo salar*), transgênico para o *gh*, para o consumo humano. Esta decisão foi tomada após rigorosos testes que comprovaram sua segurança para a saúde humana e para o meio, ressaltando ainda que não haja diferenças biológicas significativas na composição nutricional do animal transgênico quando comparado a outros salmões criados em cativeiro. Este é o primeiro animal transgênico aprovado para consumo humano nos Estados Unidos (FDA, 2015).

Vários estudos avaliando a estabilidade e validando genes de referência em zebrafish foram descritos em diferentes estudos durante os estágios de desenvolvimento, para machos e fêmeas adultos e diferentes tecidos expostos à contaminação biológica e a poluentes (FILBY; TYLER, 2007; MCCURLEY; CALLARD, 2008; HU et al., 2016; XU et al., 2016; LANG; WANG; ZHANG, 2016). No entanto, até o presente momento, não foram realizados estudos de validação de genes de referência em zebrafish transgênicos, enfatizando a importância da avaliação da estabilidade desses genes para estudos utilizando qPCR, em particular quando investigações envolvem fatores não explorados anteriormente.

Sabendo-se do crescimento do uso de animais transgênicos em pesquisa científica e da importância da utilização adequada e específica de genes de referência para determinada espécie e condição experimental, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a estabilidade de expressão de genes com diferentes funções, sendo o *actb1*, *actb2*, *atp1a*, *b2m*, *ef1a*, *ef1b*, *ef1c*, *ef1d*, *ef1e*, *ef1f*, *ef1g*, *ef1h*, *ef1i*, *ef1j*, *ef1k*, *ef1l*, *ef1m*, *ef1n*, *ef1o*, *ef1p*, *ef1q*, *ef1r*, *ef1s*, *ef1t*, *ef1u*, *ef1v*, *ef1w*, *ef1x*, *ef1y*, *ef1z*, *ef1aa*, *ef1ab*, *ef1ac*, *ef1ad*, *ef1ae*, *ef1af*, *ef1ag*, *ef1ah*, *ef1ai*, *ef1aj*, *ef1ak*, *ef1al*, *ef1am*, *ef1an*, *ef1ao*, *ef1ap*, *ef1aq*, *ef1ar*, *ef1as*, *ef1at*, *ef1au*, *ef1av*, *ef1aw*, *ef1ax*, *ef1ay*, *ef1az*, *ef1ba*, *ef1bb*, *ef1bc*, *ef1bd*, *ef1be*, *ef1bf*, *ef1bg*, *ef1bh*, *ef1bi*, *ef1bj*, *ef1bk*, *ef1bl*, *ef1bm*, *ef1bn*, *ef1bo*, *ef1bp*, *ef1bq*, *ef1br*, *ef1bs*, *ef1bt*, *ef1bu*, *ef1bv*, *ef1bw*, *ef1bx*, *ef1by*, *ef1bz*, *ef1ca*, *ef1cb*, *ef1cc*, *ef1cd*, *ef1ce*, *ef1cf*, *ef1cg*, *ef1ch*, *ef1ci*, *ef1cj*, *ef1ck*, *ef1cl*, *ef1cm*, *ef1cn*, *ef1co*, *ef1cp*, *ef1cq*, *ef1cr*, *ef1cs*, *ef1ct*, *ef1cu*, *ef1cv*, *ef1cw*, *ef1cx*, *ef1cy*, *ef1cz*, *ef1da*, *ef1db*, *ef1dc*, *ef1dd*, *ef1de*, *ef1df*, *ef1dg*, *ef1dh*, *ef1di*, *ef1dj*, *ef1dk*, *ef1dl*, *ef1dm*, *ef1dn*, *ef1do*, *ef1dp*, *ef1dq*, *ef1dr*, *ef1ds*, *ef1dt*, *ef1du*, *ef1dv*, *ef1dw*, *ef1dx*, *ef1dy*, *ef1dz*, *ef1ea*, *ef1eb*, *ef1ec*, *ef1ed*, *ef1ee*, *ef1ef*, *ef1eg*, *ef1eh*, *ef1ei*, *ef1ej*, *ef1ek*, *ef1el*, *ef1em*, *ef1en*, *ef1eo*, *ef1ep*, *ef1eq*, *ef1er*, *ef1es*, *ef1et*, *ef1eu*, *ef1ev*, *ef1ew*, *ef1ex*, *ef1ey*, *ef1ez*, *ef1fa*, *ef1fb*, *ef1fc*, *ef1fd*, *ef1fe*, *ef1ff*, *ef1fg*, *ef1fh*, *ef1fi*, *ef1fj*, *ef1fk*, *ef1fl*, *ef1fm*, *ef1fn*, *ef1fo*, *ef1fp*, *ef1fq*, *ef1fr*, *ef1fs*, *ef1ft*, *ef1fu*, *ef1fv*, *ef1fw*, *ef1fx*, *ef1fy*, *ef1fz*, *ef1ga*, *ef1gb*, *ef1gc*, *ef1gd*, *ef1ge*, *ef1gf*, *ef1gg*, *ef1gh*, *ef1gi*, *ef1gj*, *ef1gk*, *ef1gl*, *ef1gm*, *ef1gn*, *ef1go*, *ef1gp*, *ef1gq*, *ef1gr*, *ef1gs*, *ef1gt*, *ef1gu*, *ef1gv*, *ef1gw*, *ef1gx*, *ef1gy*, *ef1gz*, *ef1ha*, *ef1hb*, *ef1hc*, *ef1hd*, *ef1he*, *ef1hf*, *ef1hg*, *ef1hh*, *ef1hi*, *ef1hj*, *ef1hk*, *ef1hl*, *ef1hm*, *ef1hn*, *ef1ho*, *ef1hp*, *ef1hq*, *ef1hr*, *ef1hs*, *ef1ht*, *ef1hu*, *ef1hv*, *ef1hw*, *ef1hx*, *ef1hy*, *ef1hz*, *ef1ia*, *ef1ib*, *ef1ic*, *ef1id*, *ef1ie*, *ef1if*, *ef1ig*, *ef1ih*, *ef1ii*, *ef1ij*, *ef1ik*, *ef1il*, *ef1im*, *ef1in*, *ef1io*, *ef1ip*, *ef1iq*, *ef1ir*, *ef1is*, *ef1it*, *ef1iu*, *ef1iv*, *ef1iw*, *ef1ix*, *ef1iy*, *ef1iz*, *ef1ja*, *ef1jb*, *ef1jc*, *ef1jd*, *ef1je*, *ef1jf*, *ef1jg*, *ef1jh*, *ef1ji*, *ef1jj*, *ef1jk*, *ef1jl*, *ef1jm*, *ef1jn*, *ef1jo*, *ef1jp*, *ef1jq*, *ef1jr*, *ef1js*, *ef1jt*, *ef1ju*, *ef1jv*, *ef1jw*, *ef1jx*, *ef1jy*, *ef1jz*, *ef1ka*, *ef1kb*, *ef1kc*, *ef1kd*, *ef1ke*, *ef1kf*, *ef1kg*, *ef1kh*, *ef1ki*, *ef1kj*, *ef1kk*, *ef1kl*, *ef1km*, *ef1kn*, *ef1ko*, *ef1kp*, *ef1kq*, *ef1kr*, *ef1ks*, *ef1kt*, *ef1ku*, *ef1kv*, *ef1kw*, *ef1kx*, *ef1ky*, *ef1kz*, *ef1la*, *ef1lb*, *ef1lc*, *ef1ld*, *ef1le*, *ef1lf*, *ef1lg*, *ef1lh*, *ef1li*, *ef1lj*, *ef1lk*, *ef1ll*, *ef1lm*, *ef1ln*, *ef1lo*, *ef1lp*, *ef1lq*, *ef1lr*, *ef1ls*, *ef1lt*, *ef1lu*, *ef1lv*, *ef1lw*, *ef1lx*, *ef1ly*, *ef1lz*, *ef1ma*, *ef1mb*, *ef1mc*, *ef1md*, *ef1me*, *ef1mf*, *ef1mg*, *ef1mh*, *ef1mi*, *ef1mj*, *ef1mk*, *ef1ml*, *ef1mm*, *ef1mn*, *ef1mo*, *ef1mp*, *ef1mq*, *ef1mr*, *ef1ms*, *ef1mt*, *ef1mu*, *ef1mv*, *ef1mw*, *ef1mx*, *ef1my*, *ef1mz*, *ef1na*, *ef1nb*, *ef1nc*, *ef1nd*, *ef1ne*, *ef1nf*, *ef1ng*, *ef1nh*, *ef1ni*, *ef1nj*, *ef1nk*, *ef1nl*, *ef1nm*, *ef1nn*, *ef1no*, *ef1np*, *ef1nq*, *ef1nr*, *ef1ns*, *ef1nt*, *ef1nu*, *ef1nv*, *ef1nw*, *ef1nx*, *ef1ny*, *ef1nz*, *ef1oa*, *ef1ob*, *ef1oc*, *ef1od*, *ef1oe*, *ef1of*, *ef1og*, *ef1oh*, *ef1oi*, *ef1oj*, *ef1ok*, *ef1ol*, *ef1om*, *ef1on*, *ef1oo*, *ef1op*, *ef1oq*, *ef1or*, *ef1os*, *ef1ot*, *ef1ou*, *ef1ov*, *ef1ow*, *ef1ox*, *ef1oy*, *ef1oz*, *ef1pa*, *ef1pb*, *ef1pc*, *ef1pd*, *ef1pe*, *ef1pf*, *ef1pg*, *ef1ph*, *ef1pi*, *ef1pj*, *ef1pk*, *ef1pl*, *ef1pm*, *ef1pn*, *ef1po*, *ef1pp*, *ef1pq*, *ef1pr*, *ef1ps*, *ef1pt*, *ef1pu*, *ef1pv*, *ef1pw*, *ef1px*, *ef1py*, *ef1pz*, *ef1qa*, *ef1qb*, *ef1qc*, *ef1qd*, *ef1qe*, *ef1qf*, *ef1qg*, *ef1qh*, *ef1qi*, *ef1qj*, *ef1qk*, *ef1ql*, *ef1qm*, *ef1qn*, *ef1qo*, *ef1qp*, *ef1qq*, *ef1qr*, *ef1qs*, *ef1qt*, *ef1qu*, *ef1qv*, *ef1qw*, *ef1qx*, *ef1qy*, *ef1qz*, *ef1ra*, *ef1rb*, *ef1rc*, *ef1rd*, *ef1re*, *ef1rf*, *ef1rg*, *ef1rh*, *ef1ri*, *ef1rj*, *ef1rk*, *ef1rl*, *ef1rm*, *ef1rn*, *ef1ro*, *ef1rp*, *ef1rq*, *ef1rr*, *ef1rs*, *ef1rt*, *ef1ru*, *ef1rv*, *ef1rw*, *ef1rx*, *ef1ry*, *ef1rz*, *ef1sa*, *ef1sb*, *ef1sc*, *ef1sd*, *ef1se*, *ef1sf*, *ef1sg*, *ef1sh*, *ef1si*, *ef1sj*, *ef1sk*, *ef1sl*, *ef1sm*, *ef1sn*, *ef1so*, *ef1sp*, *ef1sq*, *ef1sr*, *ef1ss*, *ef1st*, *ef1su*, *ef1sv*, *ef1sw*, *ef1sx*, *ef1sy*, *ef1sz*, *ef1ta*, *ef1tb*, *ef1tc*, *ef1td*, *ef1te*, *ef1tf*, *ef1tg*, *ef1th*, *ef1ti*, *ef1tj*, *ef1tk*, *ef1tl*, *ef1tm*, *ef1tn*, *ef1to*, *ef1tp*, *ef1tq*, *ef1tr*, *ef1ts*, *ef1tt*, *ef1tu*, *ef1tv*, *ef1tw*, *ef1tx*, *ef1ty*, *ef1tz*, *ef1ua*, *ef1ub*, *ef1uc*, *ef1ud*, *ef1ue*, *ef1uf*, *ef1ug*, *ef1uh*, *ef1ui*, *ef1uj*, *ef1uk*, *ef1ul*, *ef1um*, *ef1un*, *ef1uo*, *ef1up*, *ef1uq*, *ef1ur*, *ef1us*, *ef1ut*, *ef1uu*, *ef1uv*, *ef1uw*, *ef1ux*, *ef1uy*, *ef1uz*, *ef1va*, *ef1vb*, *ef1vc*, *ef1vd*, *ef1ve*, *ef1vf*, *ef1vg*, *ef1vh*, *ef1vi*, *ef1vj*, *ef1vk*, *ef1vl*, *ef1vm*, *ef1vn*, *ef1vo*, *ef1vp*, *ef1vq*, *ef1vr*, *ef1vs*, *ef1vt*, *ef1vu*, *ef1vv*, *ef1vw*, *ef1vx*, *ef1vy*, *ef1vz*, *ef1wa*, *ef1wb*, *ef1wc*, *ef1wd*, *ef1we*, *ef1wf*, *ef1wg*, *ef1wh*, *ef1wi*, *ef1wj*, *ef1wk*, *ef1wl*, *ef1wm*, *ef1wn*, *ef1wo*, *ef1wp*, *ef1wq*, *ef1wr*, *ef1ws*, *ef1wt*, *ef1wu*, *ef1wv*, *ef1ww*, *ef1wx*, *ef1wy*, *ef1wz*, *ef1xa*, *ef1xb*, *ef1xc*, *ef1xd*, *ef1xe*, *ef1xf*, *ef1xg*, *ef1xh*, *ef1xi*, *ef1xj*, *ef1xk*, *ef1xl*, *ef1xm*, *ef1xn*, *ef1xo*, *ef1xp*, *ef1xq*, *ef1xr*, *ef1xs*, *ef1xt*, *ef1xu*, *ef1xv*, *ef1xw*, *ef1xx*, *ef1xy*, *ef1xz*, *ef1ya*, *ef1yb*, *ef1yc*, *ef1yd*, *ef1ye*, *ef1yf*, *ef1yg*, *ef1yh*, *ef1yi*, *ef1yj*, *ef1yk*, *ef1yl*, *ef1ym*, *ef1yn*, *ef1yo*, *ef1yp*, *ef1yq*, *ef1yr*, *ef1ys*, *ef1yt*, *ef1yu*, *ef1yv*, *ef1yw*, *ef1yx*, *ef1yy*, *ef1yz*, *ef1za*, *ef1zb*, *ef1zc*, *ef1zd*, *ef1ze*, *ef1zf*, *ef1zg*, *ef1zh*, *ef1zi*, *ef1zj*, *ef1zk*, *ef1zl*, *ef1zm*, *ef1zn*, *ef1zo*, *ef1zp*, *ef1zq*, *ef1zr*, *ef1zs*, *ef1zt*, *ef1zu*, *ef1zv*, *ef1zw*, *ef1zx*, *ef1zy*, *ef1zz*.

tuba, e *18s*, como potenciais genes de referência. Para isso, foram utilizados os modelos animais não transgênicos e o modelo transgênico da linhagem F1040 que superexpressa o hormônio *gh*, ambos sem exposição a nenhum tipo de tratamento e comparando-se apenas a estabilidade e especificidade desses genes em diferentes tecidos.

Os dados gerados nesta dissertação estão apresentados na forma de um artigo científico, que será submetido para o periódico Life Sciences.

2 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade de 13 genes candidatos a normalizadores para utilização em análises de expressão gênica relativa por qPCR em zebrafish (*Danio rerio*) não-transgênicos e gh-transgênicos da linhagem F0104.

1.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a transgenia na linhagem F0104 influencia a expressão de genes comumente utilizados como normalizadores em zebrafish selvagem.
- Determinar em zebrafish (*Danio rerio*) gh-transgênicos e não-transgênicos, dentre os genes: *actb1*, *actb2*, *atp1a*, *b2m*, *ef1 α* , *igf1*, *gapdh*, *rpl2*, *rpl7*, *rpl13 α* , *tuba*, e *18s*, os mais estáveis, em diferentes tipos de tecidos, a fim de recomendar sua utilização para estudos de análise de expressão gênica que utilizem estes animais.
- Verificar se a estabilidade dos potenciais genes normalizadores, se mantém quando diferentes tecidos coletados de zebrafish gh-transgênicos e não-transgênicos, são analisados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PCR quantitativo em tempo real

A técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que por esse feito recebeu o prêmio Nobel de química em 1993 (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). O surgimento da biologia molecular foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas e biotecnologia durante o século XX, trazendo inúmeros benefícios e desenvolvimento científico e tecnológico (ALMEIDA et al., 2010).

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR), é uma técnica já bem estabelecida, de simples realização, sendo largamente utilizada em estudos de expressão gênica uma vez que possibilita uma rápida, sensível e acurada avaliação dos níveis de mRNA em amostras biológicas (HUGGETT et al., 2005).

A PCR em tempo real é realizada utilizando-se alguns componentes que são essenciais para dar início à reação, sendo eles: tampão, cátion bivalente - Mg^{2+} e cátion monovalente - K^{+} desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP's), DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) e oligonucleotídeos iniciadores específicos ("primers"), que se ligam às extremidades 5' e 3' de uma determinada região do genoma a ser amplificada. A reação é baseada na incubação em vários ciclos de temperatura, constituídos essencialmente por 3 fases: 1) desnaturação (92 °C) do DNA da amostra, 2) anelamento (50 – 60 °C) dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA desnaturado e 3) extensão (72 °C) das cadeias de DNA a partir de cada um dos iniciadores e sob a catálise da enzima Taq DNA Polimerase (LADEIRA et al., 2011).

Essa técnica fornece uma medida simultânea da expressão gênica em várias amostras para um número limitado de genes, e é especialmente adequada quando se tem disponível um pequeno número de células. Além disso, possui vantagem quanto à velocidade, rendimento e alto potencial de automatização quando comparado aos métodos de quantificação convencional, como análises de *northern-blot*, ensaio de proteção da ribonuclease, ou RT-PCR competitiva. No entanto, esta técnica requer o mesmo tipo de normalização que os métodos tradicionais de quantificação do mRNA (VANDESOMPELE et al., 2002).

Por ser um método constituído de múltiplos passos de realização, desde a obtenção das amostras até a análise dos dados de amplificação, existe uma variabilidade particular nessa técnica, o que pode levar a uma distorção dos valores reais de expressão, caso os dados extraídos desse sistema não sejam devidamente corrigidos.

Desse modo, a normalização através do uso de genes referência, funciona como um controle interno do erro experimental, inerente à técnica de qPCR, que por si está sujeita à variações provenientes de todo o processo. Estas podem estar relacionadas à integridade e a qualidade do mRNA, à variação na taxa da enzima transcriptase reversa durante a síntese do cDNA, à quantidades diferentes de cDNA entre réplicas, bem como devido à eficiência na reação da PCR, que podem afetar a confiabilidade dos resultados e conduzir a interpretações incorretas (BUSTIN et al., 2009 ; MALLONA et al., 2010)

Uma estratégia de normalização adequada garante que as informações quantitativas geradas a partir da amplificação do material genético, permitam comparações acuradas entre as amostras. Sem uma normalização apropriada, o perfil de expressão de um gene alvo pode ser erroneamente interpretado (TRICARICO et al., 2002).

3.2 Genes de referência

Os genes de referência, também chamados *housekeeping genes*, constitutivos, normalizadores ou de manutenção, por definição, mantêm as funções metabólicas básicas das células e fornecem suporte ao longo do ciclo celular (KHIMANI et al., 2005). Eles são expressos em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do seu desenvolvimento, não devendo sofrer alteração pelos tratamentos experimentais.

Contudo, para ser utilizado como referência, um gene deve apresentar estabilidade, expressão não-regulada no tipo de amostra analisada e deve ter seu nível de expressão semelhante aos níveis de transcritos do(s) gene(s) em estudo (BUSTIN, 2000). No entanto, vários estudos têm demonstrado que os níveis de transcrição de genes tradicionalmente utilizados como genes de referência, podem variar consideravelmente em células específicas e em diferentes condições

experimentais (RADONIĆ et al., 2004; DHEDA et al., 2005; BENN et al., 2008; LANGNAESE et al., 2008; COOK et al., 2010).

Nos últimos anos, tornou-se claro que nenhum gene é expresso constitutivamente em todos os tipos de células e sob todas as condições experimentais, o que implica que a estabilidade de expressão do gene de referência escolhido tem de ser verificada antes de se iniciar qualquer estudo, especificamente para o modelo experimental que será utilizado (ANDERSEN et al., 2004).

Por essa razão, recentemente, o guia para publicação de artigos científicos com a técnica de qRT-PCR conhecido como Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR Experiments (MIQE) passou a recomendar o uso de múltiplos genes de referência no procedimento de normalização de dados de expressão gênica. Essa estratégia busca superar possíveis limitações apresentadas por um dos genes quando sob determinada condição experimental (VANDESOMPELE et al., 2002).

A normalização utilizando genes de referência é o tipo de controle interno mais utilizado, e possibilita a correção de variabilidades inerentes ao RNA como diferenças na quantidade inicial da amostra, protocolos de extração que podem copurificar inibidores e também, discrepâncias de eficiência entre as amostras durante o processo de transcrição reversa e da PCR (BUSTIN et al., 2005).

A quantificação acurada de um gene de referência verdadeiro, permite a normalização das diferenças na quantidade de DNA ou de cDNA amplificado em amostras individuais, uma vez que o gene de referência é exposto aos mesmos passos experimentais que o gene de interesse (HUGGETT et al., 2005). Segundo de Jong e colaboradores, até o momento, o uso de genes de referência é o padrão-ouro para normalizar as frações de mRNA (DE JONGE et al., 2007).

3.3 Zebrafish (*Danio rerio*) transgênico como modelo biológico

A transgênese é uma das ferramentas mais importantes da biologia molecular para estudar a expressão e a função de um gene. Para tanto, peixes transgênicos têm sido produzidos e utilizados como modelos biológicos, como é o caso do zebrafish (LIN; CHIANG; TSAI, 2016).

A primeira transferência de DNA recombinante em peixes foi realizada em 1985 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), e em 1988 produziu-se o primeiro zebrafish transgênico (STUART; MCMURRAY; WESTERFIELD, 1988). A produção de animais transgênicos é uma técnica trabalhosa, de alto custo e dependente de técnicas avançadas em biologia molecular, cultura de células, biologia reprodutiva e bioquímica (KUES; NIEMANN, 2011).

O zebrafish é um pequeno teleósteo com aproximadamente quatro cm, faz parte da família Cyprinidae, sendo uma espécie bastante conhecida pelo seu uso como peixe ornamental. É um peixe, tropical de água doce e originário da Ásia Central, encontrado principalmente na Índia (ENGESZER et al., 2007). O pioneiro a estudar esta espécie foi George Streisinger que, no final da década de 60, aplicou as técnicas de análise mutacional para estudar seu desenvolvimento embrionário (GRUNWALD; EISEN, 2002).

Embora os animais vertebrados utilizados mais comumente nas pesquisas biológicas sejam os roedores, perfazendo 95% dos estudos experimentais (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012), o zebrafish é um modelo que vem sendo introduzido com êxito no cenário científico, sendo atualmente utilizado em diversas áreas da ciência, tais como: transgênese, genética, genômica, desenvolvimento, teratologia, comportamento, toxicologia e neurociência (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; ARUNACHALAM et al., 2013).

Além disso, a transparência óptica do zebrafish permite a análise de um tecido ou órgão particular utilizando proteínas fluorescentes, sendo assim este é um excelente modelo para transgenia e outras ferramentas de manipulação gênica (RAGHUPATHY; PATNAIK; SHU, 2013; LIESCHKE; CURRIE, 2007). Assim como o peixe, os embriões destes animais também são transparentes, uma característica que inicialmente foi preponderante para seu uso como modelo experimental em embriologia e que atualmente é empregada na observação do desenvolvimento embrionário em linhagens transgênicas (SUMANAS; LIN, 2004; VATINE et al., 2011; BEM-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014).

O zebrafish possui atributos fisiológicos e anatômicos semelhantes aos dos mamíferos, é de fácil manipulação como os vertebrados pequenos e, além disso, possui o genoma completamente mapeado, que apresenta uma homologia bastante significativa com o genoma humano (SANTORIELLO; ZON, 2012). O fato de grandes segmentos dos cromossomos dessa espécie estar em sintonia com os

265 cromossomos humanos e de camundongos e de muitos seus genes apresentarem
266 um alto grau de similaridade, quando comparados em suas sequências, reafirmam
267 seu potencial como modelo biológico especialmente os que visam estudar a função
268 de genes (BARBAZUK et al., 2000).

269 O sequenciamento completo do genoma deste peixe possibilitou o
270 desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para as investigações que
271 tornaram possível testar os efeitos de uma determinada condição experimental
272 sobre a expressão genética de uma espécie ou estágio de desenvolvimento que,
273 associadas à estratégia de análise quantitativa de expressão de genes por PCR em
274 tempo real, permitem a obtenção de uma resposta integrada sobre as alterações
275 que ocorrem num determinado grupo de genes selecionados (CONCEIÇÃO et al.,
276 2009).

277 A transgênese vem ganhando espaço e o crescimento animal tem sido um dos
278 alvos mais frequentes da manipulação genética. No caso dos peixes, a técnica vem
279 sendo utilizada não apenas com o intuito de desenvolver espécies melhoradas e
280 mais produtivas, mas também buscando desenvolver modelos alternativos para
281 examinar a fisiologia do crescimento (LEGGATT et al., 2012). Nesse contexto, uma
282 linhagem (F0104) de zebrafish (*Danio rerio*) geneticamente modificada, que
283 superexpressa o gene do *gh* do peixe-rei marinho (*Odonthestes argentinensis*), foi
284 desenvolvida e pode ser utilizada para estudos no grupo de vertebrados
285 (FIGUEIREDO et al., 2007).

286

4 CAPÍTULO

4.1 Manuscrito

Manuscrito foi submetido ao Periódico Life Sciences.

Evaluation of reference genes to normalize gene expression analysis in growth hormone transgenic and non-transgenic zebrafish (*Danio rerio*)

Running Title: Reference genes in transgenic zebrafish strain

Gabriela Terra Rassier¹, Larissa Oliveira Daneluz², Amanda Weege da Silveira Martins², Eduardo Nunes Dellagostin², Hadassa Gabriela Ortiz², André Huber Cunha², William Borges Domingues², Eliza Rossi Komninou³, Tony Leandro da Silveira⁴, Luís Fernando Fernandes Martins⁴, Mateus Tavares Kutter⁴, Vinicius Farias Campos^{2*}

¹Laboratório de Genômica Estrutural, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacológicas e de Alimentos.

²Laboratório de Genômica Estrutural, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelota, Pelotas, RS, Brazil.

³Laboratório de Reprodução Animal, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelota, Pelotas, RS, Brazil.

⁴Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande

* Corresponding author: **Vinicius Farias Campos**- Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil, Cep: 96010-900. RS, Brazil; Phone number: +555332757350; E-mail: fariascampos@gmail.com.

313 Abstract

314 Real-time quantitative PCR is one of the most important techniques in the analysis of gene
315 expression and needs the use of reference genes. These genes have the function of
316 normalizing the reaction data, having an important role in the outcome and success of the
317 analysis. Reference genes must have significant and stable expression in tissues and in all
318 experimental conditions. Zebrafish (*Danio rerio*) reference genes have been studied, however,
319 as far as we know, there are no studies for the transgenic models of this species. The gh-
320 transgenic zebrafish is a strain called F0104, developed to overexpress the growth hormone
321 from silverside (*Odontheistes argentinensis*). It is assumed that the transgenic process may
322 influence the expression levels of commonly used reference genes, leading to the need to
323 validate specific reference genes for gene expression studies in transgenic zebrafish. In this
324 context, the objective of the present study was to analyze the stability of genes *actb1*, *actb2*,
325 *atp1a*, *b2m*, *eif2b*, *ef1a*, *igf1*, *gapdh*, *rpl2*, *rpl7*, *rpl13a*, *tuba*, and *18s*, in transgenic and non-
326 transgenic zebrafish, in order to evaluate their potential use as reference genes. For this, adult
327 animals of both sexes, gh-transgenic (n = 21) and non-transgenic (n = 21), constituted the
328 experimental groups. Liver, brain, intestine and muscle samples were collected from pools of
329 3 animals belonging to each of the groups. After the steps of RNA extraction, cDNA
330 synthesis and qPCR, analyzes were carried out with dCt, GeNorm, NormFinder, BestKeeper
331 and RefFinder softwares. The most stable genes for the gh-transgenic zebrafish group were
332 *rpl13a*, *ef1a*, *rpl7* and *rpl2*, whereas the less stable genes were the *gapdh*, *18s* and *tuba* genes,
333 respectively. From the obtained data, it was verified that the tissue that most influenced in the
334 instability of the genes were the intestine and the liver. This study also showed that even
335 genes considered to be constitutive and commonly used as normalizers in studies with non-
336 transgenic zebrafish, such as *gapdh*, *18s* and *tuba*, suffered variations between different
337 tissues of both transgenic and non-transgenic animals. Finally, it is concluded that the genes

rpl13a, *ef1a*, *rpl7* and *rpl2* have high stability, being possible to be used as reference genes in studies involving analysis of gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) and that genes such as *gapdh*, *18s* and *tuba* have low stability and therefore are not suitable as reference genes for the studied groups and tissues.

Keywords: RT-qPCR; housekeeping genes; transcript levels; gene expression.

Introduction

Gene expression analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) is widely used for amplification, detection and quantification of RNA in different types of biological animal samples [1]. However, for the normalization and adequate reading of the obtained data, it is necessary to use reference genes that must keep their expression stable, regardless of the conditions or stage of development, remaining constant in different tissues or under the influence of different experimental treatments [2].

Zebrafish (*Danio rerio*) is a model organism of increasing importance for developmental analyzes, disease modeling and toxicological studies [3,4]. Although there are already studies that analyze reference genes for this experimental model, further studies are still needed, since these studies evaluate genes with high instability for normalization strategies, such as *gapdh* [5], *actb* [6,7] and *18s* [8], but few of them aim to find specific reference genes for fish.

A F0104 gh-transgenic strain [9] is a zebrafish alternative model that overexpresses the hormone *gh* and holds the title of first transgenic fish strain from Brazil. Although the manipulation of the *gh* gene has shown promising results regarding growth in fish, this strainage has shown heterogenous growth in males, as well as probable early sexual maturation [10], reduced capacity of the antioxidant system [11], a significant decrease in the sperm quality parameters [12] and a decrease in the maturation of the immune system [13].

For the zebrafish, several reference genes were already analyzed in different environmental conditions, for example exposure to toxicological media [14], in different tissues and chemical tests [15] and during the developing [16]. It is currently recommended for more accurate experimental designs between 3 and 5 good reference genes [17]. For this, it would be ideal to evaluate approximately 6 to 10 candidate reference genes in each of the experimental conditions evaluated and the use of suitable software such as GeNorm or NormFinder to evaluate the stability of these candidates [18].

Based on the results obtained in previous studies developed by our research group itself and available in the literature on validation of reference genes for qPCR normalization in fish, we hypothesized that reference genes, which are often used in several studies, are not suitable genes for the zebrafish model. The present study aimed to verify the stability of a set of 13 candidates reference genes, including the 18s ribosomal (18s), Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase (gapdh), Beta-2-Microglobulin (b2m), Elongation factor 1- α (ef1a), Ribosomal protein L13 (rpl13), β -Actin (actb1), β -Actin 2 (actb2), Ribosomal protein L7 (rpl7), Ribosomal protein L2 (rpl2), Eukaryotic translation initiation factor 2B (eif2b), Na⁺/K⁺-ATPase- α (atp1a), Insulin like growth factor 1 (igf1), Tubulin- α (tuba) and which of these genes are the most indicated for normalizing gene expression analysis in qPCR using the F0104 strain.

Methods

Animals and rearing conditions

Transgenic zebrafish overexpressing *gh* used in this study were generated by Figueiredo et al. (2007) and collaborates [9]. Transgenic and non-transgenic zebrafish were obtained by the crossbreeding between F0104 strain and wild zebrafish. In addition to *gh* transgene, the *gh*-transgenic zebrafish expressed the green fluorescent protein (GFP) as a transgenic label.

The non-transgenic were brothers of T zebrafish which not incorporated the genetic construct in to its genome. For this, these animals are perfect control group.

The methodology used in this study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande / RS, Brazil, under number Pq021/2018.

Transgenic and non-transgenic fish were kept in a recirculating aquiculture system. A total of 42 adult zebrafish of both sexes (21 T and 21 NT) were raised in 6 tanks containing 10 L of water. Each tank was cleaned daily by sliding the bottom to remove any residue. The tanks were connected to a filter tank filled with zeolite, bio ceramic, a UV lamp and a heater thermostat. The fish were fed twice a day (five days a week) for apparent satiety. The diet was commercial ration (Tetra ColorBits®). The photoperiod was adjusted to 14:10 h, light / dark period. Management and maintenance of zebrafish were in compliance with the Zebrafish Book (www.zfin.org). During the breeding period, the water temperature was maintained at 26.4 ± 0.3 ° C. The water pH (7.6 ± 0.1) and dissolved oxygen (> 6 mg L⁻¹) parameters were measured daily in all tanks. Chemical parameters were measured once a week using commercial kits (Labcon Ammonia Alcon® Fresh Water, Labcon Test Nitrite Alcon®). All water parameters were maintained in requirements for zebrafish, as reported by [19].

Tissue collection

The animals were euthanized by using overdose of Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (tricaine, Sigma-Aldrich, USA) at a concentration of 400 mg/L⁻¹. The animals were weighed and measured. Samples of liver, brain, intestine and muscle of male and female adult zebrafish were collected from the non-transgenic group (control) and from gh-transgenic (treatment) group. The samples collected from 3 animals were mixed to compound a tissue pool from each group, 7 replicate tissue pools for each of the four tissues

were collected, totaling 21 tissue samples collected in each of both. After the collection, samples were stored in liquid nitrogen until the RNA extraction.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from tissue samples using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA), following the manufacturer's instructions. RNA was treated with the DNA-free® kit (Ambion, USA) to remove genomic DNA contamination. Subsequently, RNA concentration and purity were measured using a NanoVue™ Plus spectrophotometer (GE Healthcare Life Science, USA) and after, the samples were stored at -80 ° C. Complementary DNA (cDNA) was obtained using the commercial kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's recommendation at a concentration of 500ng. Reactions were performed on the SimpliAmp™ thermal cycler (Applied Biosystems, USA). Finally, the cDNA was stored at -20 ° C until use.

Gene Expression Analysis by qRT-PCR

The primers used in this study are presented in Table 2. qPCR was performed using the SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). The qRT-PCR was run in the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). The amplification conditions were 95 ° C for 10 min, 40 cycles at 95 ° C for 15 sec, and 60 ° C for 1 min, followed by the conditions necessary for the calculation of the melting curve. Were used validated primers in zebrafish (Table 2) for 14 candidate reference genes (*actb1*, *actb2*, *atp1a*, *b2m*, *eif2b*, *ef1a*, *igf1*, *gapdh*, *rpl2*, *rpl7*, *rpl13a*, *tuba*, and *18s*) belonging to different functions to evaluate expression stability. All reactions were performed in duplicate.

437 **Data analysis**

438 The normality distribution of biometry data was evaluated by the Shapiro-Wilk test.
 439 The unpaired Student's t-test (one-tailed) was used to compare the mean values. The obtained
 440 values were expressed as $g \pm$ standard error mean (SEM) and $mm \pm$ SEM for length and mass,
 441 respectively. Specific analyzes of gene expression stability were performed using the
 442 comparative method delta-Ct (dCt) [20] and GeNorm [21], NormFinder [22], BestKeeper [23]
 443 and RefFinder statistical approaches as previously reported [24-26]. The results were
 444 expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) for the dCt method; average expression stability
 445 value for GeNorm and NormFinder; Pearson correlation coefficient (r) for the BestKeeper;
 446 and geometric mean of rating values for RefFinder.

447

448 **Results**

449 **Transgenic phenotype expression**

450 The transgenic group expressed the phenotype attributed by the transgenesis, being
 451 statistically longer and heavier ($p < 0.05$) (Fig 1A and 1B, respectively) in comparison to the
 452 length and body mass of the non-transgenic group. Non-transgenic group presented $31.35 \pm$
 453 0.68 mm and the transgenic group presented 34.83 ± 0.85 mm of total length. Furthermore
 454 non-transgenic group presented 0.31 ± 0.02 g and the transgenic group presented 0.42 ± 0.03
 455 g of total mass.

456 **The comparative dCt method analysis**

457 The comparative dCt method was used to select the most stable reference gene. A low
 458 average of SD value represented a low expression variance, or high stability. The analysis
 459 revealed the following order of stability of the evaluated genes from the non-transgenic group,

from highest to lowest, without discriminating the tissues analyzed: *rpl13α* (2.1) > *ef1α* (2.16) > *rpl2* (2.21) > *rpl7*(2.22) > *actb2* (2.28) > *actb1*(2.35) > *b2m* (2.46) > *atp1a* (2.66) > *eif2b* (2.91) > *igf1*(3.34) > *tuba*(4.30) > *gapdh* (4.71) > *18s* (4.91) (Figure 2A). The analysis revealed the following order of stability of the evaluated genes of the gh-transgenic group, from largest to smallest, without taking into consideration the tissues analyzed: *rpl13α* (2.34) > *ef1α* (2.35) > *rpl7* (2.37) > *rpl2* (2.37) > *actb2* (2.52) > *actb1* (2.65) > *igf1*(2.95) > *eif2b* (2.96) > *atp1a* (2.99) > *b2m* (3.12) > *tuba* (4.79) > *18s* (5.55) > *gapdh* (Figure 2B).

GeNorm analysis

The geNorm analysis was carried out for the result data set following transformation of the Ct values into relative quantities through the $2^{(\text{minimum Ct value in a set sample} - \text{Ct value of a sample})}$ formula and compare pairwise variation (SD values) for each gene pair. Then, the geometric mean of SD values was used to calculate the M-value. The generation of low average expression stability represents a low variance. The geNorm analysis revealed the following order of stability classification of genes in the non-transgenic group, independent of tissue: *rpl13α/ef1α* (0.751) > *rpl7* (0.759) > *rpl2* (0.905) > *actb2* (1.139) > *actb1* (1.214) > *b2m* (1.282) > *atp1a* (1.382) > *eif2b* (1.615) > *igf1* (1.842) > *tuba* (2.217) > *gapdh* (2.617) > *18s* (2.970) (Figure 3A). In gh-transgenics, the stability sequence of the genes evaluated independently of the tissue, from largest to smallest was: *rpl7/rpl13α* (0.515) > *ef1α* (0.593) > *rpl2* (0.846) > *actb2* (1.158) > *actb1* (1.299) > *atp1a* (1.472) > *igf1* (1.616) > *b2m* (1.747) > *eif2b* (1.882) > *tuba* (2.854) > *18s* (2.854) > *gapdh* (3.271) (Figure 3B).

NormFinder analysis

NormFinder was applied to analyze the most stable evaluated genes. A low mean expression stability represents a low variance. The NormFinder analysis revealed that the order of stability classification in the non-transgenic group was independent of tissue: *rpl13α*

484 (0.375) > *eflα* (0.623) > *rpl2* (0.835) > *rpl7* (0.835) > *actb2* (0.957) > *actb1* (1.092) > *b2m*
 485 (1.299) > *atp1a* (1.772) > *elf2b* (1.869) > *igf1* (2.650) > *tuba* (3.854) > *gapdh* (4.295) > *18s*
 486 (4.483) (Figure 4A). In gh-transgenic, the stability sequence of the genes evaluated
 487 independently of the tissues, from largest to smallest was: *rpl13α* (0.520) > *rpl2* (0.559) >
 488 *rpl7* (0.676) > *eflα* (0.686) > *actb2* (1.054) > *actb1* (1.353) > *elf2b* (1.579) > *igf1* (1.954) >
 489 *atp1a* (2.099) > *b2m* (2.168) > *tuba* (4.323) > *18s* (5.064) > *gapdh* (5.151) (Figure 4B).

490 **BestKeeper analysis**

491 The BestKeeper analysis provided two-interpretation-ways to rank the gene stability:
 492 one based on the samples SD values of Ct and other based on the Pearson's correlation of
 493 expression among the genes. Thus, the genes with low SDs and high correlation with the
 494 BestKeeper index (indicating high similarity among the expression levels of the reference
 495 genes) are ranked as the most stable genes. To construct the consensus comprehensive
 496 ranking, the SD values were used, which is a more conservative approach. However, to
 497 construct the rankings of the most stable genes with BestKeeper, [r] and P values of Pearson's
 498 correlation were employed. This method is more sophisticated and statistically robust, as it
 499 results in the rankings more similar to the ones obtained using other algorithms. The analyzes
 500 based on Pearson's correlation revealed the following order of stability classification in the
 501 non-transgenic group independent of tissue: *rpl13α* (0.951) > *elf2b* (0.900) > *eflα* (0.894) >
 502 *rpl7* (0.852) > *actb2* (0.848) > *rpl2* (0.847) > *actb1* (0.847) > *b2m* (0.791) > *gapdh* (0.788) >
 503 *18s* (0.730) > *atp1a* (0.560) > *igf1* (0.438) > *tuba* (0.001) (Figure 5A). In gh-transgenics, the
 504 stability sequence of the genes evaluated independently of the tissues: *gapdh* (0.908) > *rpl13α*
 505 (0.895) > *rpl7* (0.867) > *elf2b* (0.867) > *rpl2* (0.862) > *eflα* (0.859) > *actb2* (0.754) > *18s*
 506 (0.712) > *actb1* (0.641) > *igf1* (0.581) > *b2m* (0.502) > *atp1a* (0.090) > *tuba* (0.001) (Figure
 507 5B).

508

509 RefFinder analysis

510 The RefFinder is an online tool used to construct a consensus comprehensive ranking
 511 of stability of RGs among all the other methods using the calculation of geometric mean for
 512 the ranks calculated by each of other algorithms. Candidate genes with the lowest geometric
 513 mean are most stable. The results were demonstrated consensually within the non-transgenic
 514 group (Figure 6A), only in the gh-transgenic group (Figure 6B) and the consensus analysis of
 515 both groups within a single analysis (Figure 6C). In the non-transgenic group, the
 516 comprehensive consensus classification constructed by RefFinder was: *rpl13a* (1.57) > *efla*
 517 (2.30) > *rpl2* (3.46) > *rpl7* (3.94) > *actb2* (4.40) > *actb1* (4.56) > *atp1a* (4.76) > *b2m* (7.24) >
 518 *EIF2B* (9.46) > *IGF1* (9.74) > *tuba* (10.74) > *gapdh* (12.24) > *18s* (12.74) (Figure 6A). In the gh-
 519 transgenic group was: *rpl13a* (1.63) > *rpl7* (2.71) > *efla* (3.31) > *rpl2* (3.36) > *actb2* (3.98) >
 520 *atp1a* (4.88) > *actb1* (5.05) > *IGF1* (7.74) > *EIF2B* (8.65) > *b2m* (9.49) > *tuba* (11.00) > *18s*
 521 (12.00) > *gapdh* (13.00) (Figure 6B). The Consensual analysis of the both groups revealed the
 522 follow ranking order: *rpl13a* (1.63) > *rpl7* (2.78) > *efla* (2.91) > *rpl2* (3.72) > *actb2* (3.98) >
 523 *atp1a* (4.74) > *actb1* (5.05) > *b2m* (7.74) > *EIF2B* (8.89) > *IGF1* (9.74) > *tuba* (10.74) > *gapdh*
 524 (12.24) > *18s* (12.74) (Figure 6C). In addition to RefFinder's chart rankings, consensus results
 525 are presented in each group and by stability in each tissue (liver, brain, intestine and muscle).
 526 In the non-transgenic group, the genes specific for each tissue were different from each other,
 527 whereas the worst genes found were the *18s* and *gapdh* in all tissues (Table 3). In the gh-
 528 transgenic group, the *actb1* gene was the most stable in intestine and muscle and *efla* was
 529 specifically stable in brain and liver. In this group *18s* was the most inappropriate gene for
 530 intestine and liver. The least stable genes in brain and muscle were *EIF2B* and *b2m*,
 531 respectively (Table 4). According to the consensus analysis of the tissues of both groups
 532 within the same analysis, the most stable gene was considered the *rpl13a* for brain and

intestine and occupying the second place for muscle. The *gapdh* gene was considered the most unstable and unsuitable gene for the study groups (Table 5).

Discussion

In this study we present the most extensive evaluation of candidates for normalizing genes para qPCR in transgenic and non-transgenic zebrafish. We evaluated 13 genes in 4 different tissues in both groups being analyzed in 5 different bioinformatic approaches. In addition, consensus analyzes were performed between the organs and between the groups.

The genes commonly used in studies with the wild zebrafish model are generally *gapdh*, *18s* and *actb*. These genes have shown conflicts in results relation to their stability. In this study, *gapdh* and *18s* showed to be the most inappropriate genes for both groups in terms of stability, with the exception of the analysis carried out using the algorithm BestKeeper, where surprisingly *gapdh* occupied the first place. In general, both *gapdh* and *18s* when analyzed separately in the tissues, occupied the last positions in almost all analyzes and statistical programs, demonstrating that they are unsuitable reference genes, that when used can seriously compromise the analysis and the accuracy of qPCR results.

In this study it was possible to verify that independent of the group, tissue and the algorithm used in the RetFinder consensus analysis, the most stable gene was considered *rpl13a*, followed by *rpl7*. However, when the consensus analysis was verified individually, considering the groups and each tissue, the stability of genes was influenced by the tissues. In this case, *rpl13a* was not the most stable in all the tissues from the different groups, but only in the intestine in the non-transgenic group. The *rpl7* gene that occupied the second position in the consensus of general stability was shown to be the second most stable in the intestine in the non-transgenic group and the second in the muscle and liver tissues in the transgenic group.

The good stability of *rpl13a* in zebrafish liver has also been demonstrated by [27] when fish were stressed with arsenate. The *rpl13a* was also shown to be a more stable and reliable gene for chemical treatments in a recent study using zebrafish [28], consistent with previous studies [16,20,30]. The results obtained by [15], were compatible with ours findings, where *rpl13a*, *rpl7*, *actb* and *ef1a* were the most suitable reference genes in liver and intestinal tissues when exposed in different concentration groups to cadmium and subsequently infected with (*Aeromonas hydrophila*) bacteria.

All the analyzes revealed a high stability of the *ef1a* gene, occupying between the first and at least the third position, except in the BestKeeper and NormFinder analysis in the transgenic group, demonstrating to be the most specific and stable gene for analysis in zebrafish brain in both the groups. This gene *ef1a* showed good stability in a study by [26] in *silverside Odontesthes humensi*. Other studies have also examined the stability of reference genes in fish and have shown that *ef1a* is a very stable gene for qPCR normalization [16,31].

As well as *gapdh* and *18s*, the *tuba* gene widely used as reference genes for fish. This gene presented high instability in our study, occupying the last position in some cases, also showing no specificity in the tissues studied compared to both experimental groups.

The differences in the stability of candidate genes are probably due to the different functions and heterogeneity of the organs [32]. The discrepancies in the ranks of the most stable genes obtained by each software reflect the differences of the algorithms and procedures of each program, and demonstrate the need to evaluate reference genes using several bioinformatic algorithms for a final evaluation [14,20]. The different results presented by each algorithm are expected due to the distinct statistical approach that was used to construct the rankings [33].

Therefore, it is important to consider that reference genes for qPCR can be altered by different experimental conditions, different organs, sex, stage of development and chemical

concentration, and it is impossible to find suitable reference genes that exhibit constant expression pattern for all species and under all experimental conditions [1,34].

According to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR Experiments (MIQE) [35], a reference gene needs to be validated and established for each species and for different physiological conditions. Our results demonstrated that although the literature has already demonstrated alterations in the metabolism of the F0104 strain, these animals in comparison to non-transgenic animals did not suffer notable variations in the expression of most part of genes.

In conclusion, these *rpl13 α* , *rpl7* and *ef1 α* genes were shown to be the most adequate genes to normalize transgenic zebrafish model data in the consensus analysis; however, when analyzed for specificity to the analyzed tissues, the *actb1* and *actb2* gene were shown to be stable and suitable for intestine and muscle, while in brain and liver, the *ef1 α* gene was shown to be the most indicated.

Reference genes for transgenic and non-transgenic zebrafish were evaluated for their best stability and these results support the use of the best organ-specific reference genes for proper interpretation of the qPCR results in transgenic zebrafish. From these results, it will be possible to evaluate gene expression data in gh-transgenic zebrafish with greater reliability, which has a important applicability for another species os fish, since the animal growth has been one of the most frequent targets for commercialization and thus evaluation of such gene expression should be routinely used.

Conclusions

In addition to indicating the most stable genes to be used as reference genes for the transgenic zebrafish, this study allowed us to conclude that genes that are normally used in mammals for qPCR assays have low stability in both transgenic and non-transgenic zebrafish models, reinforcing the importance of using species-specific genes for normalization and wherever possible, previously checked for stability based on the animal model used and the specific experimental conditions.

Acknowledgements

We are greatly thankful to Mr. Antonio Sergio Varela Junior for the critical reading of manuscript.

Funding

This study was supported by the Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital Universal #422292/2016-8) and Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS ARD-PPP # 16/2551 and FAPERGS PqG 17/2551). GTR, LOD, WBD, and ERK are individually supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. AWSM, LFFM and VFC are also individually supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Conflict of interest statement

The authors declare not having conflict of interest. No brand or trademark cited in the text have sponsored any of the authors. All authors have had access to the pre-submitted version of the manuscript and agree with the publication in Life Sciences.

Author Contributions

GTR, TS, ERK and VFC are responsible for experimental design, data analysis, manuscript writing. TS, MTK, and LFFM were responsible for fish reproduction, acclimation and maintenance. GTR, TS, AWSM, END, HGO, AHC, LOD and MTK were responsible for the biological sampling. GTR, LOD, AWSM, END, HGO, AHC, WBD and VC were responsible for the molecular biology, from RNA extraction to qRT-PCR analysis. TS, MTK, and LFFM were responsible for the biometry analysis. LFM was responsible by generation of transgenic zebrafish.

References

- [1] Y. Tang, J. Yu, P. Xu, J. Li, H. Li, H. Ren, Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian), Fish & Shellfish Immunology. 33 (2012) 775–779. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.027.
- [2] S.A. Bustin, V. Benes, T. Nolan, M.W. Pfaffl, Quantitative real-time RT-PCR – a perspective, Journal of Molecular Endocrinology. 34 (2005) 597–601. doi:10.1677/jme.1.01755.
- [3] A. Dodd, P.M. Curtis, L.C. Williams, D.R. Love, Zebrafish: bridging the gap between development and disease, Hum Mol Genet. 9 (2000) 2443–2449. doi:10.1093/hmg/9.16.2443.
- [4] H. Sukardi, C.Y. Ung, Z. Gong, S.H. Lam, Incorporating Zebrafish Omics into Chemical Biology and Toxicology, Zebrafish. 7 (2010) 41–52. doi:10.1089/zeb.2009.0636.
- [5] C.-H. Lin, C.-L. Huang, C.-H. Yang, T.-H. Lee, P.-P. Hwang, Time-course changes in the expression of Na, K-ATPase and the morphometry of mitochondrion-rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during freshwater acclimation, Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology. 301A (2004) 85–96. doi:10.1002/jez.a.20007.
- [6] C.Y. Choi, K.W. An, Cloning and expression of Na⁺/K⁺-ATPase and osmotic stress

- transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* during osmotic stress, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 149 (2008) 91–100. doi:10.1016/j.cbpb.2007.08.009.
- [7] C.M. Nawata, S. Hirose, T. Nakada, C.M. Wood, A. Kato, Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure, Journal of Experimental Biology. 213 (2010) 3150–3160. doi:10.1242/jeb.044719.
- [8] A.K. Sinha, A.F. Dasan, R. Rasoloniriana, N. Pipralia, R. Blust, G. De Boeck, Hypoosmotic stress-induced physiological and ion-osmoregulatory responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) are modulated differentially by nutritional status, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 181 (2015) 87–99. doi:10.1016/j.cbpa.2014.11.024.
- [9] M. de A. Figueiredo, C.F.C. Lanes, D.V. Almeida, L.F. Marins, Improving the production of transgenic fish germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy, Genetics and Molecular Biology. 30 (2007) 31–36. doi:10.1590/S1415-47572007000100008.
- [10] R.Y. Kuradomi, M.A. Figueiredo, C.F.C. Lanes, C.E. da Rosa, D.V. Almeida, R. Maggioni, M.D.P. Silva, L.F. Marins, GH overexpression causes muscle hypertrophy independent from local IGF-I in a zebrafish transgenic model, Transgenic Research. 20 (2011) 513–521. doi:10.1007/s11248-010-9429-y.
- [11] C.E. da Rosa, R.Y. Kuradomi, D.V. Almeida, C.F.C. Lanes, M. de A. Figueiredo, A.G. Dytz, D.B. Fonseca, L.F. Marins, GH overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish, Experimental Gerontology. 45 (2010) 449–456. doi:10.1016/j.exger.2010.03.012.
- [12] M.A. Figueiredo, E.A. Mareco, M.D.P. Silva, L.F. Marins, Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish, Transgenic Res. 21 (2012) 457–469. doi:10.1007/s11248-011-9546-2.
- [13] C.R. Batista, M.A. Figueiredo, D.V. Almeida, L.A. Romano, L.F. Marins, Impairment of the immune system in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*), Fish & Shellfish Immunology. 36 (2014) 519–524. doi:10.1016/j.fsi.2013.12.022.

- 691 [14] M.L. Jaramillo, A.G. Pereira, C.E. Davico, L. Nezzi, D. Ammar, Y.M.R. Müller,
692 E.M. Nazari, Evaluation of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR assays
693 in organs of zebrafish exposed to glyphosate-based herbicide, Roundup, *Animal*. 12 (2018)
694 1424–1434. doi:10.1017/S1751731117003111.
- 695 [15] X. Lang, L. Wang, Z. Zhang, Stability evaluation of reference genes for real-time
696 PCR in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and subsequently infected by
697 bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Aquatic Toxicology*. 170 (2016) 240–250.
698 doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.029.
- 699 [16] R. Tang, A. Dodd, D. Lai, W.C. McNabb, D.R. Love, Validation of Zebrafish (*Danio*
700 *rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization, *Acta*
701 *BiochimBiophys Sin (Shanghai)*. 39 (2007) 384–390. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x.
- 702 [17] S. Taylor, M. Wakem, G. Dijkman, M. Alsarraj, M. Nguyen, A practical approach to
703 RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines, *Methods*. 50 (2010) S1–
704 S5. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- 705 [18] S.C. Taylor, E.M. Mrkusich, The State of RT-Quantitative PCR: Firsthand
706 Observations of Implementation of Minimum Information for the Publication of
707 QuantitativeReal-Time PCR Experiments (MIQE), *MMB*. 24 (2014) 46–52.
708 doi:10.1159/000356189.
- 709 [19] B. Reed, M. Jennings, Guidance on the housing and care of zebrafish *Danio rerio*.,
710 Guidance on the Housing and Care of Zebrafish *Danio Rerio*. (2011).
711 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133283946> (accessed March 17, 2019).
- 712 [20] N. Silver, S. Best, J. Jiang, S.L. Thein, Selection of housekeeping genes for gene
713 expression studies in human reticulocytes using real-time PCR, *BMC Molecular Biology*. 7
714 (2006) 33. doi:10.1186/1471-2199-7-33.
- 715 [21] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F.
716 Speleman, Accurate normalization of real-time 706 quantitative RT-PCR data by geometric
717 averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*. 3 (2002) research 0034.1.
718 doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- 719 [22] C.L. Andersen, J.L. Jensen, T.F. Ørntoft, Normalization of Real-Time Quantitative

- Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets, *Cancer Res.* 64 (2004) 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- [23] M.W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians, Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnology Letters*. 26 (2004) 509–515. doi:10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47.
- [24] C.G. Yang, X.L. Wang, J. Tian, W. Liu, F. Wu, M. Jiang, H. Wen, Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Gene*. 527 (2013) 183–192. doi:10.1016/j.gene.2013.06.013.
- [25] F.A. Taki, A.A. Abdel-Rahman, B. Zhang, A Comprehensive Approach to Identify Reliable Reference Gene Candidates to Investigate the Link between Alcoholism and Endocrinology in Sprague-Dawley Rats, *PLOS ONE*. 9 (2014) e94311. doi:10.1371/journal.pone.0094311.
- [26] T.L.R. Silveira, W.B. Domingues, M.H. Remião, L. Santos, B. Barreto, I.M. Lessa, A.S. Varela Junior, D. Martins Pires, C. Corcini, T. Collares, F.K. Seixas, R.B. Robaldo, V.F. Campos, Evaluation of Reference Genes to Analyze Gene Expression in Silverside *Odontesthes humensis* Under Different Environmental Conditions, *Frontiers in Genetics*. 9 (2018). doi:10.3389/fgene.2018.00075.
- [27] H. Xu, S.H. Lam, Y. Shen, Z. Gong, Genome-Wide Identification of Molecular Pathways and Biomarkers in Response to Arsenic Exposure in Zebrafish Liver, *PLOS ONE*. 8 (2013) e68737. doi:10.1371/journal.pone.0068737.
- [28] H. Xu, C. Li, Q. Zeng, I. Agrawal, X. Zhu, Z. Gong, Genome-wide identification of suitable zebrafish *Danio rerio* reference genes for normalization of gene expression data by RT-qPCR: reliable reference genes in danio rerio, *Journal of Fish Biology*. 88 (2016) 2095–2110. doi:10.1111/jfb.12915.
- [29] K.M. Curtis, L.A. Gomez, C. Rios, E. Garbayo, A.P. Raval, M.A. Perez-Pinzon, P.C. Schiller, EF1 α and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells, *BMC Molecular Biology*. 11 (2010) 61. doi:10.1186/1471-2199-11-61.

- [30] B.R. Everaert, G.A. Boulet, J.-P. Timmermans, C.J. Vrints, Importance of Suitable Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR: Special Reference to Mouse Myocardial Infarction Studies, PLOS ONE. 6 (2011) e23793. doi:10.1371/journal.pone.0023793.
- [31] Q. Hu, W. Guo, Y. Gao, R. Tang, D. Li, Reference gene selection for real-time RT-PCR normalization in rice field eel (*Monopterus albus*) during gonad development, Fish Physiology and Biochemistry. 40 (2014) 1721–1730. doi:10.1007/s10695-014-9962-3.
- [32] H. Gong, L. Sun, B. Chen, Y. Han, J. Pang, W. Wu, R. Qi, T. Zhang, Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction, Scientific Reports. 6 (2016) 38513. doi:10.1038/srep38513.
- [33] C. Liu, N. Xin, Y. Zhai, L. Jiang, J. Zhai, Q. Zhang, J. Qi, Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time RT-PCR Normalization in the Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) at Different Developmental Stages, in Various Tissue Types and on Exposure to Chemicals, PLOS ONE. 9 (2014) e91715. doi:10.1371/journal.pone.0091715.
- [34] W. Zheng, L. Sun, Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Fish & Shellfish Immunology. 30 (2011) 638–645. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.014.
- [35] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, Clinical Chemistry. 55 (2009) 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.

Table 1. Summary of candidate reference genes evaluated in the present study.

Gene name	Gene symbol	Biologic function	GenBank accession no.
18s ribosomal RNA	<i>18s</i>	Ribosomal subunit	FJ915075
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>gapdh</i>	Glycolytic enzyme	BC095386
Beta-2- microglobulin	<i>b2m</i>	Beta chain of major histocompatibility	BC062841
Elongation factor 1- α	<i>ef1a</i>	Factor for protein translation	NM_131263
Ribosomal protein L13	<i>rpl13a</i>	60S ribosomal protein	NM 212784
β -Actin 1	<i>actb1</i>	Cytoskeletal protein	NM_131031
β -Actin 2	<i>actb2</i>	Cytoskeletal protein	NM_181601
Ribosomal protein L7	<i>rpl7</i>	60S ribosomal protein	NM 213644
Ribosomal protein L2	<i>rpl2</i>	60S ribosomal protein	NM 212743
Eukaryotic translation initiation factor 2B	<i>eif2b</i>	Heterotrimeric G protein	NM_212675
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase- α	<i>atp1a</i>	Active transport of Na ⁺ and K ⁺	NM_131686
Insulin Like Growth Factor 1	<i>igf-1</i>	Growth factor	NM131825
Tubulin α	<i>tuba</i>	Cytoskeletal protein	NM 194388

784 **Table 2.** Primers sequences used for real-time PCR.

Primers	Sequence 5'→3'	Reference
<i>18s</i>	F: TGCATGGCCGTTCTTAGTTG R: AGTCTCGTTCGTTATCGGAATGA	[26]
<i>gapdh</i>	F: GATGGTCATGCAATCACAGTCTA R: ATCATACTTGGCAGGTTTCTCAA	[15]
<i>b2m</i>	F: GCCTCCACCCCAGAGAAAGG R: GCGGTTTTTATTACATGTTG	[26]
<i>ef1α</i>	F: GGGCAAGGGCTCCTTCAA R: CGCTCGGCCTTCAGTTTG	[12]
<i>rpl13α</i>	F: TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R: AGACGCACAATCTTGAGAGCA	[15]
<i>actb1</i>	F: GCTGTTTTCCCCTCCATTGTT R: TCCCATGCCAACCATCACT	[26]
<i>actb2</i>	F: TGACCGAGCGTGGCTGCTACA R: CTTGATGTCACGGACAATTTCTCT	*
<i>rpl7</i>	F: CAGAGGTATCAATGGTGTGAGCCC R: TTCGGAGCATGTTGATGGAGGC	[15]
<i>rpl2</i>	F: GCCAAAGCCCATGTCTTCA R: GGGATCGAGGCTGATGATGA	[15]
<i>ef1b</i>	F: GAAAGCCAACAAGTAGAAGCAAA R: ACCCTGTTCAAAAGCTCATCATA	*
<i>atp1a</i>	F: GCGGAGAAGGCCGAGAACAA R: TTGCCCCCTGCTCTGA	[27]
<i>igf-1</i>	F: CAGGCAAATCTCCACGATCTC R: TTTGGTGTGGAATATCTG	[12]
<i>tubaα</i>	F: GAGACCGGAGCTGGAAAACA R: GGAAACCCTGGAGACCTGTG	[15]

785
786
787

Table 3. Comprehensive consensual stability ranking of the candidate reference genes in non transgenic zebrafish (*Danio rerio*) across the different tissues calculated by RefFinder algorithm. Data are expressed as geometric mean of ranking values.

Non-transgenic group		Tissues							
		Brain		Intestine		Liver		Muscle	
Ranking	1	<i>ef1α</i>	1,41	<i>rpl13α</i>	1,57	<i>actb1</i>	1,19	<i>actb2</i>	2,28
	2	<i>rpl2</i>	2,63	<i>rpl7</i>	2,45	<i>actb2</i>	1,68	<i>rpl13α</i>	2,51
	3	<i>rpl13α</i>	2,82	<i>tuba</i>	3,13	<i>rpl7</i>	3,31	<i>atp1a</i>	2,91
	4	<i>actb1</i>	3,74	<i>b2m</i>	3,44	<i>atp1a</i>	4,05	<i>actb1</i>	3,56
	5	<i>actb2</i>	4,36	<i>ef1α</i>	3,74	<i>rpl13α</i>	5,09	<i>b2m</i>	4,70
	6	<i>rpl7</i>	5,24	<i>atp1a</i>	6,26	<i>ef1α</i>	5,21	<i>rpl2</i>	5,62
	7	<i>atp1a</i>	5,89	<i>actb1</i>	6,47	<i>b2m</i>	6,90	<i>rpl7</i>	5,83
	8	<i>gapdh</i>	7,11	<i>actb2</i>	6,64	<i>rpl2</i>	7,11	<i>ef1α</i>	6,24
	9	<i>ef2b</i>	9,72	<i>rpl2</i>	7,77	<i>ef2b</i>	8,74	<i>tuba</i>	7,42
	10	<i>b2m</i>	9,97	<i>igf1</i>	9,69	<i>tuba</i>	10,00	<i>igf1</i>	7,95
	11	<i>tuba</i>	10,09	<i>e1f2b</i>	10,74	<i>igf1</i>	11,00	<i>ef2b</i>	9,97
	12	<i>igf1</i>	10,98	<i>18s</i>	12,00	<i>18s</i>	12,24	<i>gapdh</i>	12,00
	13	<i>18s</i>	13,00	<i>gapdh</i>	13,00	<i>gapdh</i>	12,74	<i>18s</i>	13,00

Table 4. Comprehensive consensual stability ranking of the candidate reference genes in gh-transgenic zebrafish (*Danio rerio*) (strain F0104) across the different tissues calculated by RefFinder algorithm. Data are expressed as geometric mean of ranking values.

Transgenic group		Tissues							
		Brain		Intestine		Liver		Muscle	
Ranking	1	<i>ef1α</i>	1,50	<i>actb1</i>	1,68	<i>ef1α</i>	1,41	<i>actb1</i>	1,73
	2	<i>rpl13α</i>	2,00	<i>actb2</i>	2,06	<i>rpl7</i>	2,63	<i>rpl7</i>	2,83
	3	<i>actb2</i>	3,41	<i>ef1α</i>	2,71	<i>atp1a</i>	3,35	<i>actb2</i>	2,91
	4	<i>actb1</i>	3,50	<i>atp1a</i>	2,74	<i>rpl2</i>	3,50	<i>ef1α</i>	3,16
	5	<i>atp1a</i>	3,72	<i>rpl13α</i>	5,32	<i>rpl13α</i>	3,94	<i>rpl13α</i>	5,18
	6	<i>b2m</i>	5,09	<i>rpl2</i>	5,83	<i>b2m</i>	4,74	<i>tuba</i>	6,34
	7	<i>igf1</i>	6,48	<i>rpl7</i>	6,30	<i>actb1</i>	6,05	<i>gapdh</i>	6,45
	8	<i>rpl7</i>	7,97	<i>igf1</i>	7,94	<i>igf1</i>	7,30	<i>rpl2</i>	7,01
	9	<i>rpl2</i>	9,46	<i>b2m</i>	8,11	<i>actb2</i>	8,49	<i>atp1a</i>	7,65
	10	<i>tuba</i>	9,46	<i>tuba</i>	9,46	<i>gapdh</i>	10,00	<i>EIF2B</i>	8,63
	11	<i>gapdh</i>	11,24	<i>EIF2B</i>	11,00	<i>tuba</i>	11,24	<i>18S</i>	9,12
	12	<i>18S</i>	12,17	<i>gapdh</i>	12,00	<i>EIF2B</i>	11,74	<i>igf1</i>	9,97
	13	<i>EIF2B</i>	12,24	<i>18S</i>	13,00	<i>18S</i>	13,00	<i>b2m</i>	13,00

Table 5. Comprehensive consensual stability ranking of the candidate reference genes in both non-transgenic and gh-transgenic zebrafish (*Danio rerio*) (strain F0104) across the different tissues calculated by RefFinder algorithm. Data are expressed as geometric mean of ranking values.

Consensus between the groups		Tissues							
		Brain		Intestine		Liver		Muscle	
Ranking	1	<i>rpl13α</i>	1,86	<i>rpl13α</i>	2,14	<i>rpl7</i>	1,73	<i>actb2</i>	1,68
	2	<i>ef1a</i>	1,93	<i>actb1</i>	2,21	<i>ef1a</i>	2,38	<i>rpl13α</i>	2,38
	3	<i>rpl7</i>	3,83	<i>ef1a</i>	2,78	<i>rpl13α</i>	3,71	<i>atp1a</i>	2,63
	4	<i>rpl2</i>	4,16	<i>actb2</i>	2,99	<i>rpl2</i>	4,47	<i>actb1</i>	3,00
	5	<i>actb1</i>	4,76	<i>atp1a</i>	3,81	<i>b2m</i>	4,68	<i>ef1α</i>	4,95
	6	<i>b2m</i>	4,95	<i>rpl7</i>	6,00	<i>actb2</i>	5,24	<i>rpl7</i>	5,45
	7	<i>actb2</i>	5,12	<i>rpl2</i>	6,16	<i>atp1a</i>	5,33	<i>tuba</i>	5,96
	8	<i>igf1</i>	6,00	<i>b2m</i>	6,51	<i>actb1</i>	5,47	<i>rpl2</i>	7,33
	9	<i>atp1a</i>	7,95	<i>tuba</i>	8,45	<i>EIF2B</i>	7,97	<i>EIF2B</i>	9,19
	10	<i>EIF2B</i>	9,24	<i>igf1</i>	10,00	<i>tuba</i>	9,64	<i>b2m</i>	9,82
	11	<i>18s</i>	11,24	<i>EIF2B</i>	11,00	<i>igf1</i>	9,97	<i>igf1</i>	10,00
	12	<i>tuba</i>	11,74	<i>gapdh</i>	12,00	<i>18s</i>	10,74	<i>18s</i>	12,00
	13	<i>gapdh</i>	13,00	<i>18s</i>	13,00	<i>gapdh</i>	13,00	<i>gapdh</i>	13,00

Figure Captions

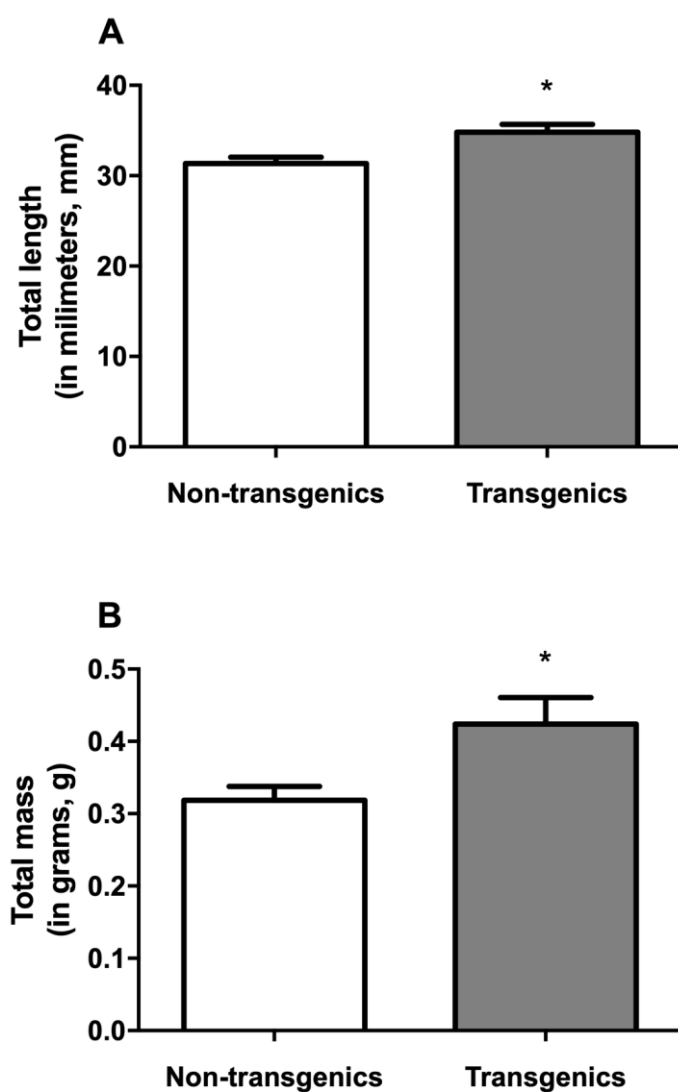


Figure 1. Biometry of non-transgenic and gh-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). Total length (A) and total mass (B) in non-transgenic zebrafish and in gh-transgenic zebrafish (strain F0104). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Asterisk indicate significant difference mean values between groups (n = 21; p < 0.05).

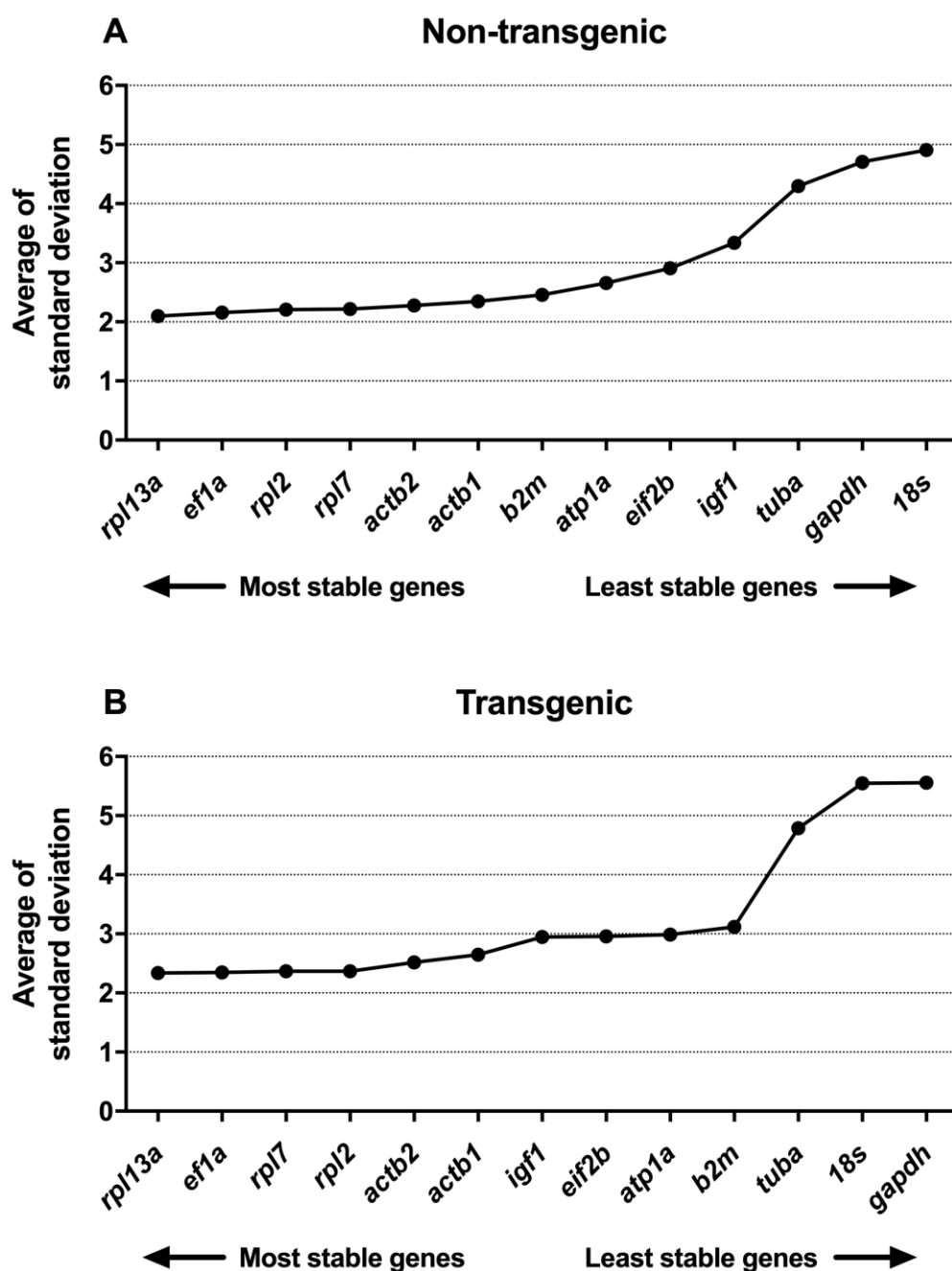


Figure. Stability analysis of the candidates reference genes in non-transgenic and transgenic zebrafish (*Danio rerio*) calculated by dCt method. General gene expression stability in non-transgenic zebrafish (A) and in gh-transgenic zebrafish (strain F0104). Data are expressed as average of standard deviation. The most stable genes are displayed on the left, and the least stable genes are displayed on the right of the x-axis.

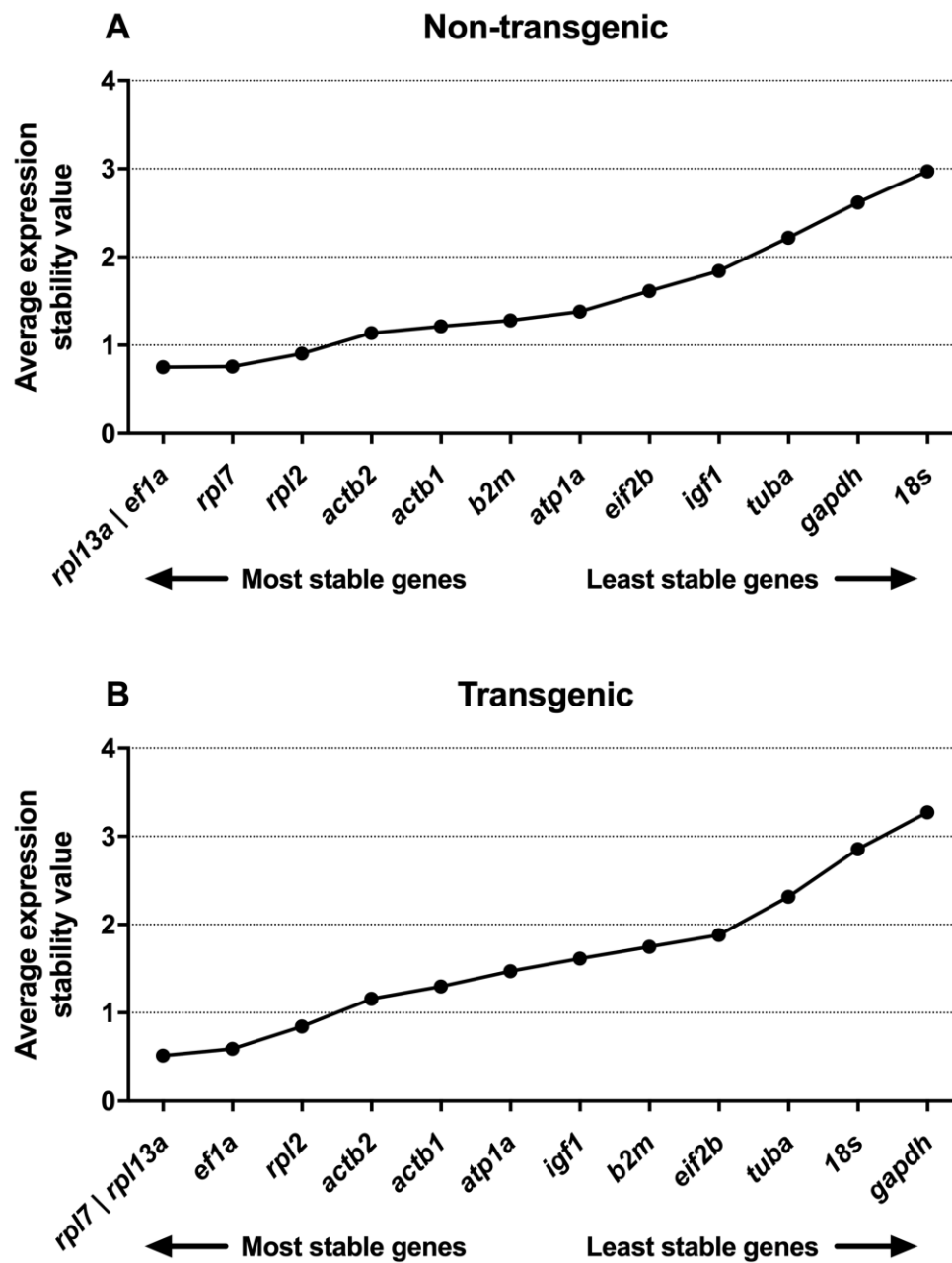


Figure 3. Stability analysis of the candidates reference genes in non-transgenic and transgenic zebrafish (*Danio rerio*) calculated by geNorm algorithm. General gene expression stability in non-transgenic zebrafish (A) and in *gh*-transgenic zebrafish (strain F0104). Data are expressed as average expression stability values. The most stable genes are displayed on the left, and the least stable genes are displayed on the right of the x-axis.

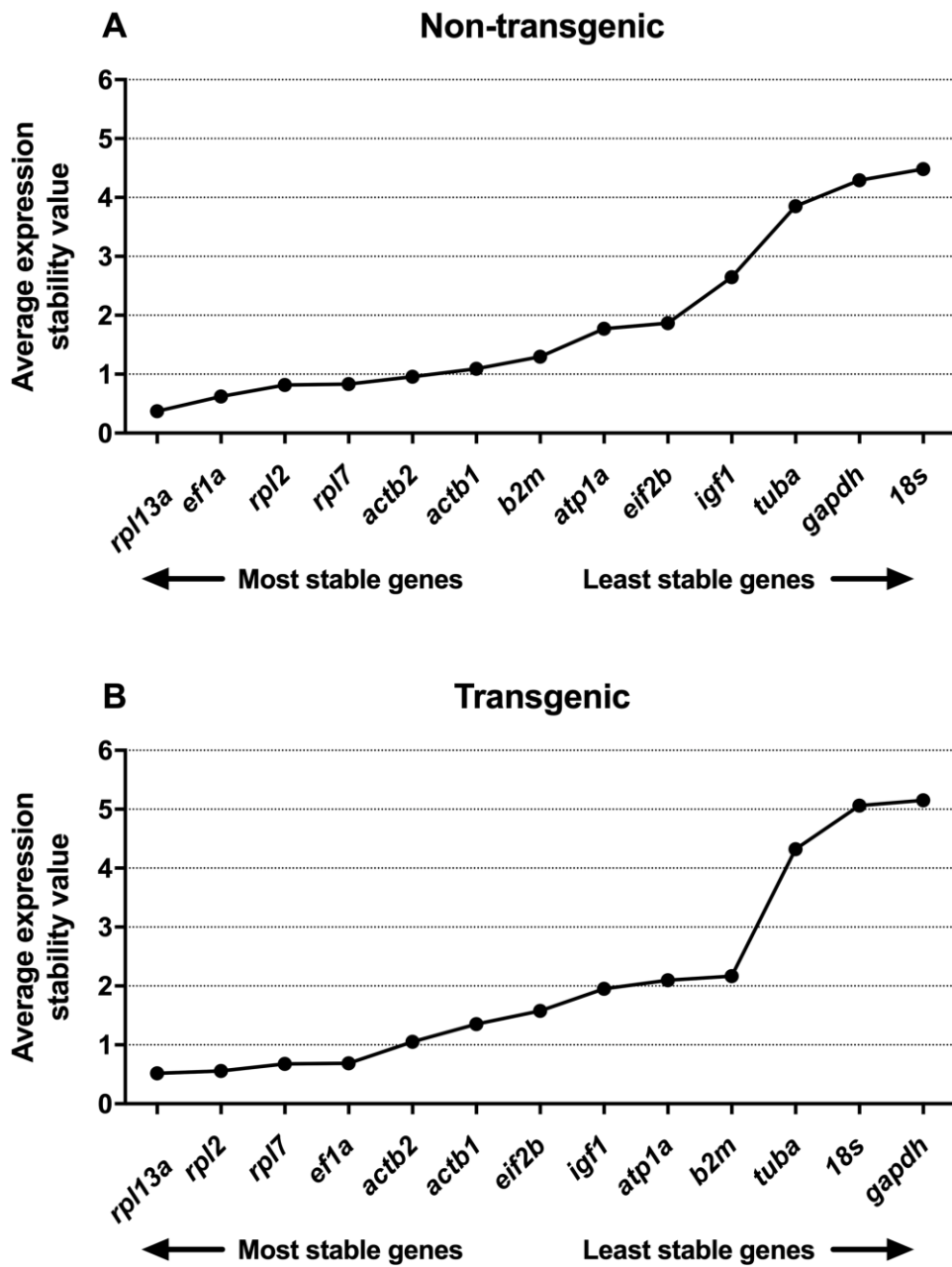


Figure 4. Stability analysis of the candidates reference genes in non-transgenic and transgenic zebrafish (*Danio rerio*) calculated by NormFinder algorithm. General gene expression stability in non-transgenic zebrafish (A) and in gh-transgenic zebrafish (strain F0104). Data are expressed as average expression stability values. The most stable genes are displayed on the left, and the least stable genes are displayed on the right of the x-axis.

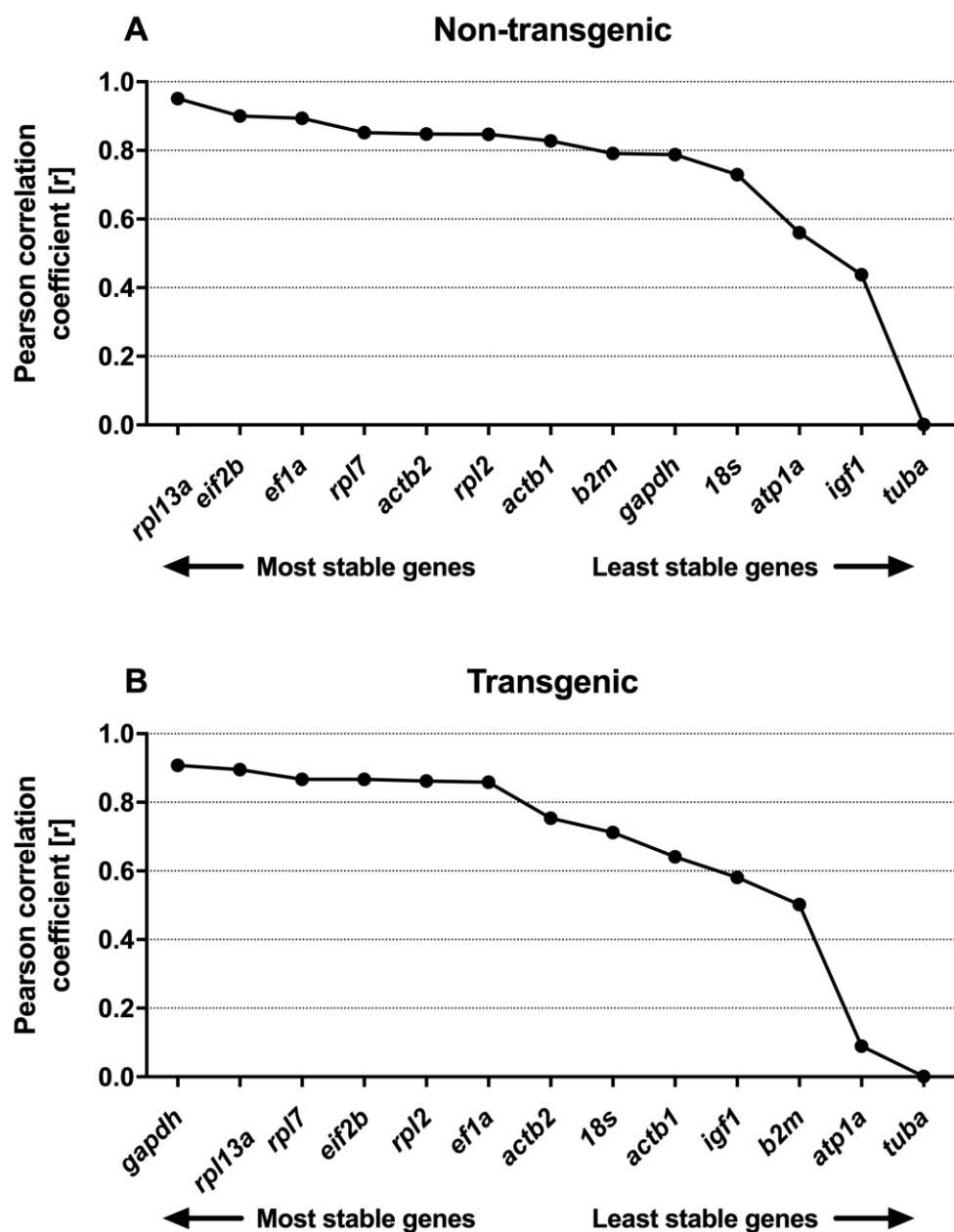


Figure 5. Stability analysis of the candidates reference genes in non-transgenic and transgenic zebrafish (*Danio rerio*) calculated by BestKeeper algorithm. General gene expression stability in non-transgenic zebrafish (A) and in gh-transgenic zebrafish (strain F0104). Data are expressed as Pearson's correlation coefficient. The most stable genes are displayed on the left, and the least stable genes are displayed on the right of the x-axis.

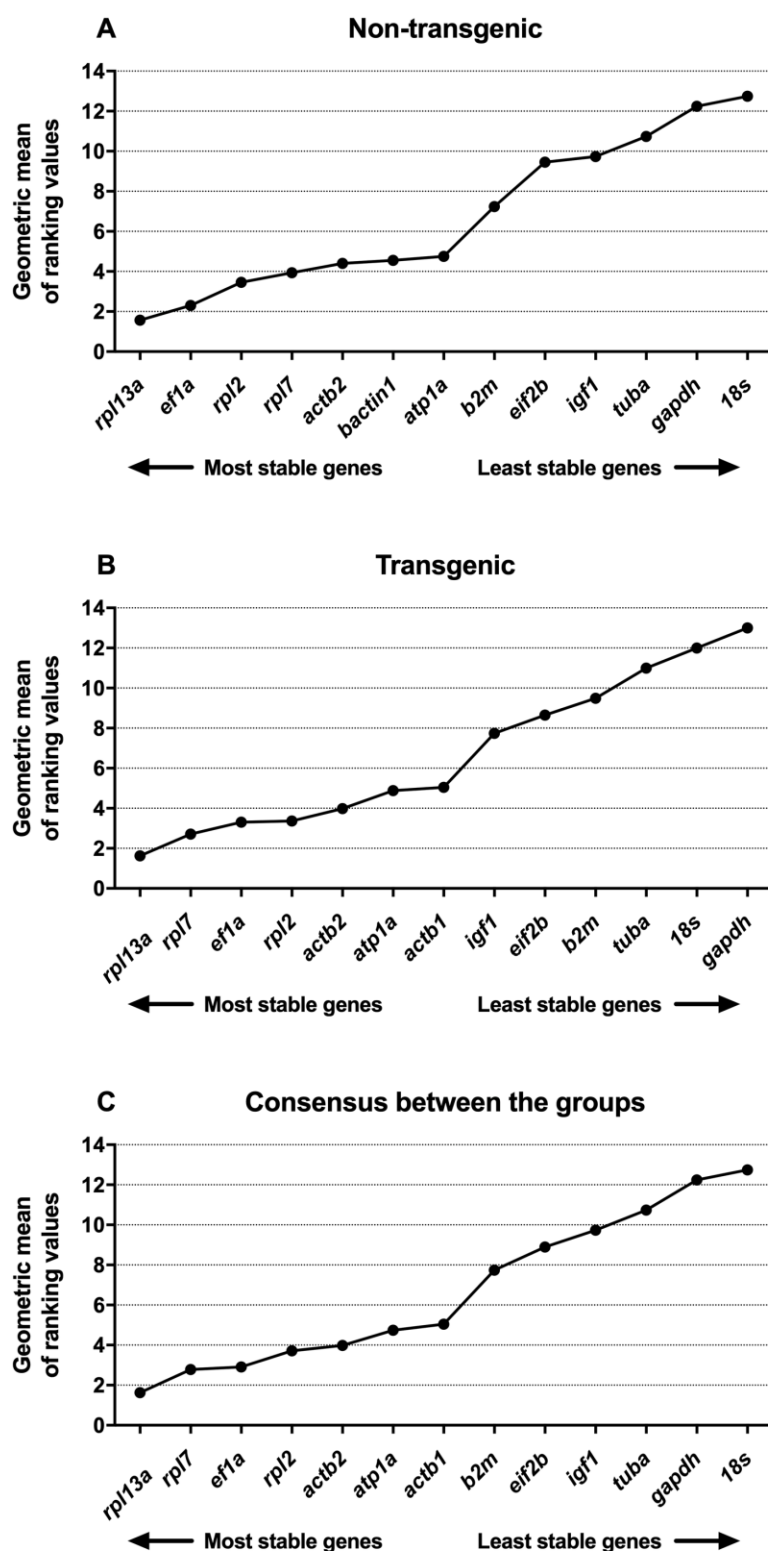


Figure 6. Consensus stability analysis of the candidates reference genes in non-transgenic and transgenic zebrafish (*Danio rerio*) calculated by RefFinder algorithm. General gene expression stability in non-transgenic zebrafish (A); in gh-transgenic zebrafish (strain F0104)

(B); and final consensus stability analysis between all methods and grouping the both non-transgenic and gh-transgenic groups (C). Data are expressed as geometric mean of ranking values. The most stable genes are displayed on the left, and the least stable genes are displayed on the right of the x-axis.

5 CONCLUSÃO GERAL

Os genes *18s*, *gapdh* e *tuba*, amplamente utilizados como normalizadores, se mostraram, genes com alta instabilidade e impróprios como normalizadores. O zebrafish gh-transgênico, embora seja da mesma espécie do não-transgênico, comprovou que para cada condição experimental, existe um gene mais adequado e específico, e que a validação e o conhecimento prévio desses genes antes de cada estudo, são de suma importância. A transgênese desenvolvida nesse animal foi capaz de alterar o perfil da expressão de genes que seriam considerados apropriados para o zebrafish não-transgênico. Entretanto, utilizando diversos algoritmos, foi possível encontrar genes adequados e comuns aos dois grupos analisados. Tanto o *rpl13a*, *rpl7* e o gene *ef1a*, podem ser utilizados de forma segura em ambos os grupos, respeitando a especificidade para cada tecido analisado. Os resultados deste trabalho evidenciam a importância da escolha adequada do gene de referência como normalizador para determinada condição experimental, demonstrando a instabilidade de genes comumente utilizados e contribuindo para estudos futuros que envolvam a análise de expressão gênica em zebrafish gh-transgênico.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. et al. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2010.
- ANDERSEN, Claus Lindbjerg; JENSEN, Jens Ledet; ØRNTTOFT, Torben Falck. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- BARBAZUK, W. Bradley et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome research**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.
- BEN-MOSHE, Zohar; FOULKES, Nicholas S.; GOTHILF, Yoav. Functional development of the circadian clock in the zebrafish pineal gland. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- BENN, Caroline L.; FOX, Helen; BATES, Gillian P. Optimisation of region-specific reference gene selection and relative gene expression analysis methods for pre-clinical trials of Huntington's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 3, n. 1, p. 17, 2008.
- BUSTIN, Stephen A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.
- BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. **Journal of molecular endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.
- BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CARTER, Lucy. Re-interpreting some common objections to three transgenic applications: GM foods, xenotransplantation and germ line gene modification (GLGM). **Transgenic research**, v. 13, n. 6, p. 583-591, 2004.
- CONCEIÇÃO, Luís Eugénio Castanheira da et al. Recent advances in nutrition of fish larval| Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 26-35, 2009.
- COOK, Naomi L. et al. Reference genes for normalising gene expression data in collagenase-induced rat intracerebral haemorrhage. **BMC molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 7, 2010

- 911 DAI, Yu-Jie et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental**
 912 **toxicology and chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11-17, 2014.
 913
- 914 DE JONGE, Hendrik JM et al. Evidence based selection of housekeeping genes.
 915 **PloS one**, v. 2, n. 9, p. e898, 2007.
 916
- 917 DERVEAUX, Stefaan; VANDESOMPELE, Jo; HELLEMANS, Jan. How to do
 918 successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p.
 919 227-230, 2010.
- 920 DHEDA, K. et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-
 921 time reverse transcription PCR data normalization. **Analytical biochemistry**, v. 344,
 922 n. 1, p. 141-143, 2005.
 923
- 924 DUNHAM, R.A. Aquaculture and fisheries biotechnology: **Genetic approaches**.
 925 Cambridge, Mass.: CABI Publishing p. 372, 2004.
 926
- 927 ENGESZER, Raymond E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and
 928 new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007.
- 929 FDA. **Salmão transgênico para alimentação humana**. Disponível em: <www.
 930 revistapesquisa.fapesp.br/2015/12/15/salmao-transgenico-para-alimentacao-
 931 humana/> Acesso em: 13 de março de 2018
- 932 FIGUEIREDO, Márcio de Azevedo et al. Improving the production of transgenic fish
 933 germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green
 934 fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy.
 935 **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 31-36, 2007.
- 936 FILBY, Amy L.; TYLER, Charles R. Appropriate housekeeping genes for use in
 937 expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. **BMC molecular**
 938 **biology**, v. 8, n. 1, p. 10, 2007.
- 939 GRUNWALD, David Jonah; EISEN, Judith S. Headwaters of the zebrafish—
 940 emergence of a new model vertebrate. **Nature reviews genetics**, v. 3, n. 9, p. 717,
 941 2002.
- 942 HOUDEBINE, Louis-Marie. La transgenèse et ses applications médicales.
 943 **Pathologie Biologie**, v. 50, n. 6, p. 380-387, 2002.
 944
- 945 HU, Yu; XIE, Shuying; YAO, Jihua. Identification of novel reference genes suitable
 946 for qRT-PCR normalization with respect to the zebrafish developmental stage. **Plos**
 947 **one**, v. 11, n. 2, p. e0149277, 2016.
 948
- 949 HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations.
 950 **Genes and immunity**, v. 6, n. 4, p. 279, 2005.

- 951 KHIMANI, Anis H. et al. Housekeeping genes in cancer: normalization of array data.
952 **Biotechniques**, v. 38, n. 5, p. 739-745, 2005.
- 953
- 954 KUES, Wilfried A.; NIEMANN, Heiner. Advances in farm animal transgenesis.
955 **Preventive veterinary medicine**, v. 102, n. 2, p. 146-156, 2011.
- 956
- 957 DE LADEIRA, Pedro Ribeiro Soares; ISAAC, Cesar; FERREIRA, Marcus Castro.
958 Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista de**
959 **Medicina**, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011.
- 960
- 961 LANG, Xingping; WANG, Lan; ZHANG, Zuobing. Stability evaluation of reference
962 genes for real-time PCR in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and
963 subsequently infected by bacteria *Aeromonas hydrophila*. **Aquatic Toxicology**, v.
964 170, p. 240-250, 2016.
- 965
- 966 LANGNAESE, Kristina et al. Selection of reference genes for quantitative real-time
967 PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. **BMC molecular biology**, v. 9, n. 1, p.
968 53, 2008.
- 969
- 970 LEGGATT, Rosalind A. et al. Growth of growth hormone transgenic coho salmon
971 *Oncorhynchus kisutch* is influenced by construct promoter type and family line.
972 **Aquaculture**, v. 356, p. 193-199, 2012.
- 973
- 974 LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D. Animal models of human disease:
975 zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353, 2007.
- 976
- 977 LIN, Cheng-Yung; CHIANG, Cheng-Yi; TSAI, Huai-Jen. Zebrafish and Medaka: new
978 model organisms for modern biomedical research. **Journal of biomedical science**,
979 v. 23, n. 1, p. 19, 2016.
- 980
- 981 MALLONA, Izaskun et al. Validation of reference genes for quantitative real-time
982 PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. **BMC plant biology**, v.
983 10, n. 1, p. 4, 2010.
- 984 MCCURLEY, Amy T.; CALLARD, Gloria V. Characterization of housekeeping genes
985 in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage
986 and chemical treatment. **BMC molecular biology**, v. 9, n. 1, p. 102, 2008.
- 987 MINISTERIO DA SAUDE. Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia
988 Marinha no Brasil. Série B. **Textos Básicos de Saúde**, p. 134, 2010.
- 989
- 990 NOVAIS, Caroline M.; PIRES-ALVES, Melissa; SILVA, F. F. PCR em tempo real.
991 **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

- 992 RADONIĆ, Aleksandar et al. Guideline to reference gene selection for quantitative
993 real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 313,
994 n. 4, p. 856-862, 2004.
- 995
- 996 RAGHUPATHY, R. K.; PATNAIK, S. R.; SHU, X. Transgenic zebrafish models for
997 understanding retinitis pigmentosa. **Clon Transgen**, v. 2, n. 110, p. 2, 2013.
- 998
- 999 SANTORIELLO, Cristina; ZON, Leonard I. Hooked! Modeling human disease in
1000 zebrafish. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2337-2343, 2012.
- 1001
- 1002 SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz.
1003 Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e**
1004 **Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.
- 1005
- 1006 STUART, GARY W.; MCMURRAY, JAMES V.; WESTERFIELD, MONTE.
1007 Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences
1008 injected into early zebrafish embryos. **Development**, v. 103, n. 2, p. 403-412, 1988.
- 1009
- 1010 SUMANAS, Saulius; LIN, Shuo. Zebrafish as a model system for drug target
1011 screening and validation. **Drug Discovery Today: Targets**, v. 3, n. 3, p. 89-96,
1012 2004.
- 1013
- 1014 TANG, Yong-kai et al. Identification of housekeeping genes suitable for gene
1015 expression analysis in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian). **Fish & shellfish**
1016 **immunology**, v. 33, n. 4, p. 775-779, 2012.
- 1017
- 1018 TRICARICO, Carmela et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase
1019 chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate
1020 for human tissue biopsies. **Analytical biochemistry**, v. 309, n. 2, p. 293-300, 2002.
- 1021
- 1022 VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR
1023 data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v.
1024 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002.
- 1025
- 1026 VANHAUWAERT, Suzanne et al. RT-qPCR gene expression analysis in zebrafish:
1027 Preanalytical precautions and use of expressed repetitive elements for normalization.
1028 In: **Methods in cell biology**. Academic Press, 2016. p. 329-342.
- 1029
- 1030 VATINE, Gad et al. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. **FEBS**
1031 **letters**, v. 585, n. 10, p. 1485-1494, 2011.
- 1032
- 1033 XU, H. et al. Genome-wide identification of suitable zebrafish *Danio rerio* reference
1034 genes for normalization of gene expression data by RT-qPCR. **Journal of fish**
biology, v. 88, n. 6, p. 2095-2110, 2016.

- 1035 ZBIKOWSKA, Halina M. Fish can be first—advances in fish transgenesis for
1036 commercial applications. **Transgenic Research**, v. 12, n. 4, p. 379-389, 2003.
1037
- 1038 ZHENG, Wen-jiang; SUN, Li. Evaluation of housekeeping genes as references for
1039 quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder
1040 (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 2, p. 638-645,
1041 2011.

1042

1043 7 ANEXOS

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

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



CERTIFICADO Nº P046/2018

Certificamos que o projeto intitulado "Influência da superexpressão do Hormônio do Crescimento (GH) na digestão e absorção de proteínas em zebrafish (*Danio rerio*)", protocolo nº 23116.008403/2018-32, sob a responsabilidade de Luis Fernando Fernandes Marins - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 28 de novembro de 2018 (Ata 011/2018).

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

CEUA Nº	Pq021/2018
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Bruna Félix da Silva Nornberg; Mateus Tavares Kütter; Marcela Gonçalves Meirelles; Tony Leandro Rezende da Silveira
VIGÊNCIA DO PROJETO	31/12/2020
ESPÉCIE/ LINHAGEM / RAÇA	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)
NÚMERO DE ANIMAIS	80
PESO/ IDADE	200 – 300 mg/ 6 meses
SEXO	Ambos
ORIGEM	Laboratório de Transgênicos, Instituto de Ciências Biológicas, FURG
ENVIO DO RELATÓRIO PARCIAL	Janeiro de 2020
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Janeiro de 2021

Rio Grande, 28 de novembro de 2018.

Med. Vet. Márcio de Azevedo Figueiredo
Coordenador da CEUA-FURG

1044

1045

Elsevier Editorial System(tm) for Life
Sciences
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluation of reference genes to normalize gene expression analysis in growth hormone transgenic and non-transgenic zebrafish (*Danio rerio*)

Article Type: Full length article

Keywords: algorithm; normalization; stability; quantitative PCR

Corresponding Author: Dr. Vinicius Farias Campos, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pelotas

First Author: Gabriela T Rassier

Order of Authors: Gabriela T Rassier; Larissa O Daneluz; Amanda W Martins; Hadassa G Ortiz; André H Cunha; William B Domingues; Eliza R Komninou, PhD; Tony Leandro R Silveira, PhD; Mateus T Kutter; Luis Fernando F Marins, PhD; Vinicius Farias Campos, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Aims: This Zebrafish transgenic model overexpress the growth hormone and has been used in several studies that aims to elucidate the effects of gh transgenesis on fish somatotrophic axis. Quantitative PCR is the main technique for gene expression analysis and needs reference genes. It is assumed that the transgenic process may influence the expression levels of commonly used reference genes. These genes have been studied for non-transgenic zebrafish, however, as far as we know, there are no studies for the transgenic models of this species. Main methods: The objective of the present study was to evaluate the stability of 13 reference genes in transgenic and non-transgenic fish. Analyses were carried out with GeNorm, RefFinder, dCt, BestKeeper and NormFinder softwares.