

IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DOS GENES DE *LDH-A* E *LDH-B* EM TRÊS ESPÉCIES DE CHARACIFORMES DA AMAZÔNIA

Nayara Sousa CASTRO¹; Andrea GHELFI²; Vera Maria Fonseca de Almeida e VAL³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Coorientadora UFAM; ³Orientadora CPBO /INPA

1. Introdução

Muitos habitats aquáticos são caracterizados por episódios periódicos ou prolongados de baixa concentração de oxigênio ou hipóxia, além de variações na temperatura e os organismos que sobrevivem nestes ambientes utilizam um conjunto de comportamentos, ajustes fisiológicos e bioquímicos (Kramer 1987; Van Den Thillart *et al.* 1985). Nos ecossistemas aquáticos da bacia amazônica, tais fatores e uma série de diferenças limnológicas favoreceram a adaptação dos peixes a ambientes em constantes mudanças (Almeida-Val *et al.* 1999a). Tal adaptação tem sido apontada como principal causa da diversidade e como um importante agente seletivo na história evolutiva dos peixes amazônicos (Val 1993). Em populações naturais de organismos aquáticos, os genes envolvidos no metabolismo anaeróbico, como *ldh-a* e *ldh-b* (lactato desidrogenase L-Lactato: NADH oxidoreductase, E.C.1.1.1.27) podem ser submetidos a forte pressão seletiva (Segal e Schulte *et al.* 1996). Por este motivo, estudos sobre tais genes têm ganhado importância na comunidade científica em função da sua relação com a evolução e o desenvolvimento de mecanismos adaptativos (Almeida-Val *et al.* 1995; Rees *et al.* 2001; Zakhartsev *et al.* 2003; Somero 2004; Johns e Somero 2004). Dessa forma, é importante a caracterização desses genes, bem como investigações sobre o seu papel na aclimação térmica ou na capacidade de lidar com estresse térmico. Assim, três espécies de Characiformes foram escolhidas para o trabalho – *Colossoma macropomum*, *Pygocentrus nattereri* e *Brycon amazonicus*. O objetivo deste trabalho foi obter sequências parciais dos genes de *ldh-a* e *ldh-b* para análises de sequências nucleotídicas e de sequências de aminoácidos.

2. Material e Métodos

Foram utilizados três indivíduos de cada espécie, tambaqui (*Colossoma macropomum*) e matrinxã (*Brycon amazonicus*) provenientes de um criador local situado na Fazenda Santo Antônio AM 010 (Manaus/AM) e piranha (*Pigocentrus nattereri*) obtida no Lago Catalão, próximo ao encontro dos rios Solimões e Negro respectivamente. Amostras de músculo branco foram usadas para a extração de DNA genômico seguindo a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). Para avaliação da integridade do DNA extraído, uma alíquota da amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e corado com Gelred (GR-Uniscience) e, em seguida, quantificado em ng/μL no espectrofotômetro Nano drop 2000/Thermo Scientific. As reações de amplificação dos genes foram realizadas no termociclador Veriti/ Applied Biosystems, com primer (*ldh-b* 1F, 1R) em TM^o 50°C (*Colossoma macropomum* e *Brycon amazonicus*) e TM^o 54°C (*Pigocentrus nattereri*) e com primer (*ldh-a* 2F, 2R) em TM^o 50°C. Após a reação foi realizada análise da concentração das amostras e as bandas específicas de cada gene foram obtidas e purificadas pelo sistema de gel de agarose E-Gel@CloneWell / Invitrogen conforme instruções do fabricante.

O sequenciamento foi obtido com o kit Big Dye^R Terminator V3.1 Cycle Sequencing. As sequências foram analisadas pelo programa BLAST, disponível no banco de dados NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>) para busca de similaridade e confirmação do gene. Posteriormente foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW (Larkin 2007) e BIOEDIT (Hall 1999). As comparações entre sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram feitas a partir dos dados gerados com sequências baixadas no banco de dados online GenBank do NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>).

3. Resultados e discussão

Foram sequenciados fragmentos com 487 nucleotídeos de *ldh-a* em Matrinxã (*Brycon amazonicus*) Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e Piranha (*Pigocentrus nattereri*) e fragmentos com cerca de 510 nucleotídeos de *ldh-b*. Com a caracterização parcial da região do gene *ldh-b* foram identificados, nas três espécies, dois exons; o primeiro corresponde ao

exon três do gene, com 108 nucleotídeos; o segundo corresponde ao exon quatro com 84 nucleotídeos e três introns foram encontrados. O terceiro intron do gene, com 92 nucleotídeos, o início do quarto intron com 23 nucleotídeos, e parte do segundo intron, com 198 a 200 nucleotídeos (Figura 1) também foram sequenciados. Em relação ao gene de *ldh-a* (Figura 2) foram identificados dois exons, um corresponde ao exon dois do gene com 96 nucleotídeos e o outro ao exon três do gene com 273 nucleotídeos. Quanto aos introns, o intron dois apresenta 88 nucleotídeos, parte do terceiro mostrou apenas 23 nucleotídeos e no final do primeiro intron do gene foram sequenciados apenas nove nucleotídeos.

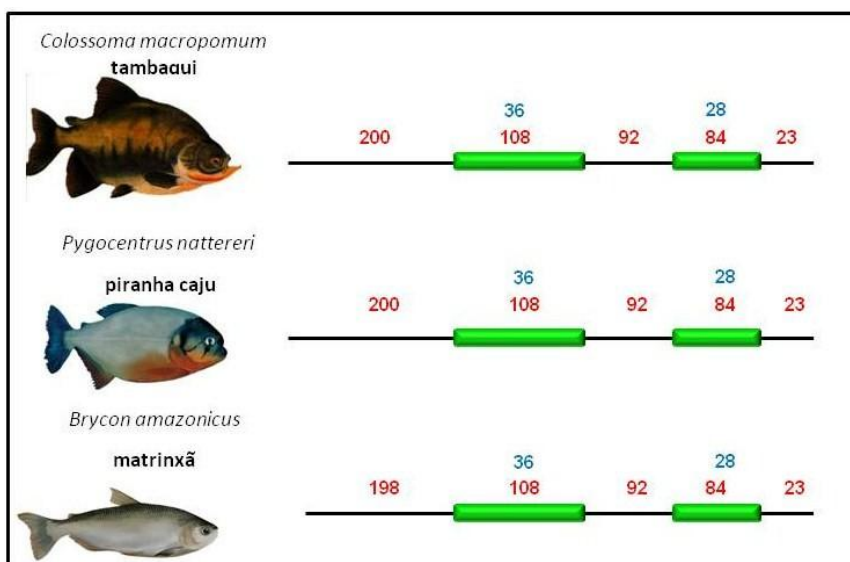


Figura 1 - Mapa genético comparativo do gene de *ldh-b* de Characiformes. Exon (caixas verdes) e intron (barras pretas) tamanhos em número de pares de base (pb) são dadas acima da respectiva representação gráfica (em vermelho). Numeração em azul acima (números de aminoácidos de cada exon).

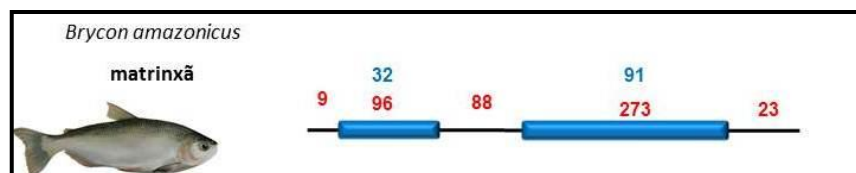


Figura 2 - Mapa genético exemplo do gene de *ldh-a*. Exon (caixas azuis) e intron (barras pretas) tamanhos em número de pares de base (pb) são dadas acima da respectiva representação gráfica (em vermelho). Numeração em azul acima (números de aminoácidos de cada exon).

Estas sequências foram traduzidas e comparadas com sequências de aminoácidos de algumas espécies de peixes das ordens Perciformes, Tetraodontiformes, Gadiformes e Cypriniformes, disponíveis no banco de dados do NCBI. Foram observadas algumas substituições nas espécies em estudo em relação às demais espécies comparadas, como a serina na posição 30 foi substituída por uma histidina (ser30his), ala39ser e iso9met ou iso9leu, além das substituições lis12, ser24, lis28, iso32 e his46 no gene de *ldh-b* (Figura 3). Substituições também foram observadas no gene de *ldh-a*.

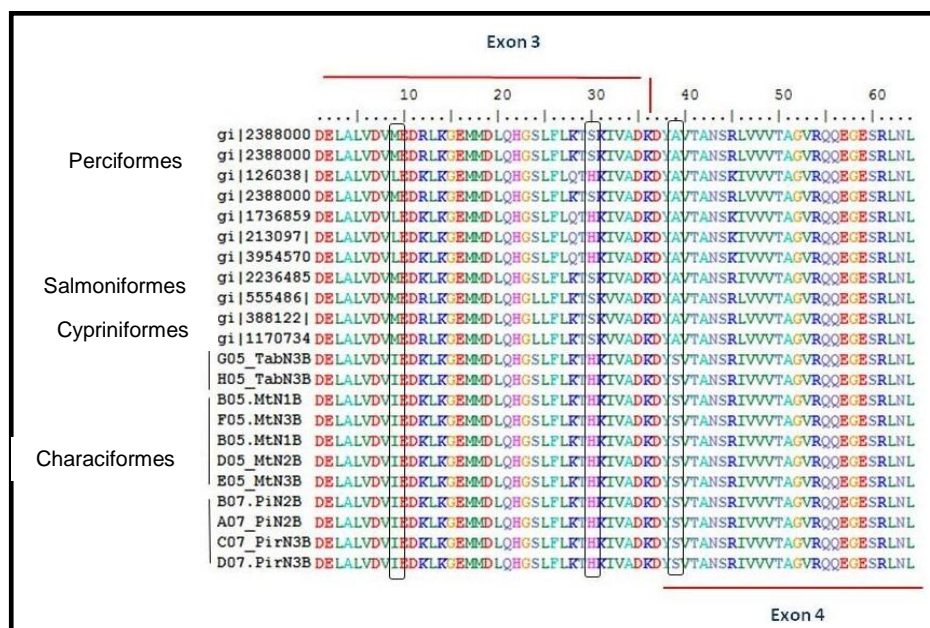


Figura 3 - Alinhamento de aminoácidos do gene de *ldh-b* de Characiformes com espécies do banco de dados GenBank. 36 primeiros resíduos corresponde ao exon 3 e os 28 últimos resíduos corresponde ao exon 4. Em destaque, substituições de aminoácidos.

A comparação de sequências de aminoácidos e de nucleotídeos vem sendo estudada em peixes congêneres e de mesma ordem, pois estes genes ortólogos apresentam apenas pequenas diferenças nas sequências. A alteração funcional da LDH dependendo de variações de temperatura no ambiente tem sido uma questão central no estudo da adaptação térmica, incluindo análises de afinidades a substrato, propriedades termodinâmicas e mudanças na estrutura da enzima que pode causar alterações funcionais na enzima (Hochachka e Somero 1984; Danilenko *et al.* 1998; Fields *et al.* 2001, 2002; Fields e Somero 1998). Tais estudos têm demonstrado que apenas algumas substituições de aminoácidos são suficientes para provocar adaptações à temperatura (Holand *et al.*, 1997; Somero 2004) e as diferenças de desempenho aeróbico, quando associadas ao nível de expressão do gene *ldh-b* (Powers e Schulte 1998).

Todos os exons encontrados são conservados em tamanho entre as três espécies em relação ao gene *ldh-b*. Além disso, as sequências intrônicas mostraram poucas variações nos nucleotídeos, indicando que nessa região do gene e especificamente nessas espécies estudadas, o gene se mantém extremamente conservado. Entretanto, apesar do elevado nível de conservação também observado para o gene *ldh-a*, houve pequenas variações nas regiões de introns e exons. A exemplo dos níveis de conservação e identidade das sequências dos genes, em *ldh-b* a similaridade entre de *B. amazonicus* e *P. natereri* é de 97,8% e de 96% entre *P. natereri* e *C. macropomum*, valores próximos à similaridade de exons: 98,9% entre *B. amazonicus* e *P. natereri*, e 100% entre *B. amazonicus* e *C. macropomum*. Esse nível de conservação também foi observado em regiões do gene em duas espécies de Perciformes, *Lates* sp (Edmunds 2009).

A região dos exons apresenta ainda domínios conservados que são fundamentalmente importantes na atividade do gene, correspondem ao domínio NAD (P) e aos domínios LDH/MDH. Nessas regiões foram encontradas as substituições citadas anteriormente.

O alto nível de conservação dessa região obtida do gene entre as espécies pode estar diretamente relacionado à conservação funcional do domínio, o qual está relacionado à manutenção do metabolismo anaeróbico. No entanto, as substituições aqui encontradas podem ser importantes para a adaptação destas espécies. A homologia de sequências nas regiões não-codificadoras pode indicar uma ligação com a funcionalidade do gene.

4. Conclusão

Estes resultados iniciais, como o sequenciamento de parte dos genes e identificação de exons e introns, bem como as substituições de aminoácidos em regiões conservadas diretamente ligadas a funcionalidade dos genes, são preponderantes para a completa caracterização e identificação dos genes *ldh-a* e *ldh-b*, as quais visam fornecer subsídios para a melhor compreensão do papel fisiológico que estas enzimas desempenham na adaptação térmica e na aclimação de espécies de peixes amazônicos.

5. Referências

Almeida-Val, V.M.F.; Farias I.P.; Silva M.N.P.; Duncan W.P.; Val A.L. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28: 1257-1263.

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Walker, I. 1999a. Long and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂ levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: *Biology of Tropical Fishes*. pp: 185-206. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.

Danilenko, A. N.; Persikov, A. V.; Polosukhina, E. S.; *et al.* 1998. Thermodynamic properties of lactate dehydrogenase from muscles of fishes adapted to different environmental temperatures. *Biofizika*, 43: 26-30.

Edmunds, RC. 2009. Comparative characterization of a temperature responsive gene (lactate dehydrogenase-B, *ldh-b*) in two congeneric tropical fish, *Lates calcarifer* and *Lates niloticus*. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6):558-569.

Fields, P. A.; Somero, G. N. 1998. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 95: 11476-11481.

Fields, P. A.; Wahlstrand, B. D.; Somero, G. N. 2001. Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes. The interaction of solutes and temperature on A4-lactate dehydrogenase orthologs from warm-adapted and cold-adapted marine fishes. *Eur. J. Biochem*, 268: 4497-4505.

Fields, P. A.; Kim, Y. S.; Carpenter, J. F.; Somero, G. N. 2002. Temperature adaptation in Gillichthys (Teleost: Gobiidae) A (4) -lactate dehydrogenases: identical primary structures produce subtly different conformations. *J. Exp. Biol*, 205: 1293-1303.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95 - 98.

Holland, L.Z.; McFall-Ngai, M.; Somero, G.N.1997. Evolution of lactate dehydrogenase-A homologs of barracuda fishes (genus *Sphyrna*) from different thermal environments: differences in kinetic properties and thermal stability are due to amino acid substitutions outside the active site. *Biochemistry*, 36: 3207-3215.

Hochachka, P. W. e Somero, G. N. 1984. *Biochemical Adaptation*. New Jersey: Princeton University Press.

Johns, G.C; Somero, G.N. 2004. Evolutionary Convergence in Adaptation of Proteins to Temperature: A4-Lactate Dehydrogenases of Pacific Damsel fishes (*Chromis* spp.). *Mol.Biol.Evol*, 21(2):314-320.

Kramer, D.L. 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes*, 18: 81-92.

Larkin, M.A. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-2948.
Powers, D.A e Schulte, P.M. 1998. Evolutionary Adaptations of Gene Structure and Expression in Natural Populations in Relation to a Changing Environment: A Multidisciplinary Approach to Address the Million-Year Saga of a Small Fish. *J Exp Zool Comp Exp Biol*, 282: 71-94.

Rees, B.B; Bowman, J.A.L.; Schulte, P.M. 2001. Structure and Sequence Conservation of a Putative Hypoxia Response Element in the Lactate Dehydrogenase-B Gene of *Fundulus*. *Biol.Bull*, 200: 247–251.

Segal, J.A; Schulte, P.M.; POWERS, D.A., *et al.*1996. Descriptive and Functional Characterization of Variation in the *Fundulus heteroclitus* Ldh-B Proximal Promoter. *J Exp Zool Comp Exp Biol*, 275: 355-364.

Somero N.G.2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic strategies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 139: 321–333.

Sambrook, J.; Russel, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EUA, 633–664.

Van den Thillart, G.; Van Waarde, A. 1985. Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Molecular. Physiology*, 8: 393-409.

Val, A.L. 1993. Adaptations of fish to extreme conditions in fresh water. In: *The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life*, (J.E. Bicudo, ed.) pp: 43-53.

Zakhartsev, M. V.; Wachter, D.B.; Sartoris, F. J.; Pörtner, H. O. e Blust, R. 2003. Thermal physiology of common eelpout (*Zoarces viviparus*). *J. Comp. Physiol*, B 173: 365-378.