

VER-002

MONTAGEM DE UM BANCO DE DNA PARA PEIXES DAS ORDENS GYMNOTIFORMES E SILURIFORMES NO INPA.

Jacqueline da Silva Batista ⁽¹⁾; José Antônio Alves Gomes ⁽²⁾
Bolsista CNPq/PIBIC ⁽¹⁾; Pesquisador INPA/CPBA ⁽²⁾

O DNA (ácido desoxiribonucleico) é a molécula da hereditariedade em todos os organismos procarióticos e eucarióticos (STRYER, 1981) e por ser o reservatório de informações genéticas dos organismos, ocupa uma posição única e central entre as macromoléculas biológicas. As seqüências nucleotídicas do DNA, em última análise, determinam as estruturas primárias de todos os RNAs, proteínas celulares e enzimas, podendo direta ou indiretamente afetar a síntese de todos os constituintes celulares, determinando o tamanho, a forma e a função dos tecidos dos seres vivos (LEHNINGER, 1995). Segundo BEIGUELMAN (1982) o DNA é, quimicamente, um polissacarídeo, isto é um polímero de nucleotídeo, os quais podem ser liberados por hidrólise catalisada por enzimas. Cada nucleotídeo é constituindo além de outros compostos de uma base nitrogenada de purina ou de pirimidina. A base púrica é a adenina e guanina, enquanto a base pirimídica é a citosina e a timina. A figura 01 mostra a molécula de DNA com as quatro bases pareadas. Segundo LEHNINGER, (1995) os nucleotídeos são compostos ricos em energia que direcionam os processos metabólicos (principalmente as biossínteses) em todas as células. Os genes de todas as células são feitos de DNA que possui duas cadeias polinucleotídicas helicoidais enroladas em torno de um eixo comum. Essas moléculas são muito longas afim de que seja codificado um grande número de proteínas necessárias ao metabolismo dos seres vivos (STRYER, 1988).

Considerando-se que as Ordens Gymnotiformes (peixes elétricos) e Siluriformes (bagres), além de serem considerados grupos irmãos (FINK AND FINK, 1981) - ou seja, essas duas ordens de peixes possuem um ancestral comum que não é dividido com mais nenhum outro grupo de peixes -, elas perfazem um percentual significativo da ictiofauna amazônica. Em função disso, estas ordens têm valor acadêmico muito importante em diversas áreas de pesquisas que também estudam, segundo MOLLER, (1995) a evolução do órgão elétrico das espécies da ordem Gymnotiformes e a eletroreceptividade das espécies da ordem Siluriforme. Estudos moleculares poderão auxiliar de uma maneira fundamental o entendimento de vários aspectos da biologia destes grupos. A base de qualquer estudo genético-molecular está na extração e preservação do DNA das espécies em estudo. A montagem de um banco de DNA é de crítica importância para futuros estudos que incluam a utilização de qualquer porção de Genoma das espécies das ordens citadas.

Este projeto teve o objetivo de criar, no laboratório de biologia molecular do INPA, um banco de dados que contenha o DNA extraído do maior número de espécies possíveis das ordens Gymnotiformes e Siluriformes, para que este banco sirva como fonte de material para estudos futuros na área genético-molecular destas ordens de peixes.

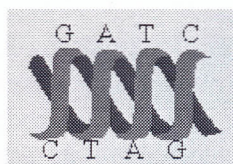
Os Espécimes das ordens Gymnotiformes e Siluriformes foram coletados em excursões de campo próprias do projeto em vários locais da Amazônia como Tarumã, Catalão, Ilha da Marchantaria e Lago do Janauacá com o auxílio de aparelho detector de peixe elétrico, redes e puçás de malha inferior a 1 cm. Outros foram coletados por colegas de outros projetos. Os espécimens foram preservados em álcool 70%. O material coletado foi identificado com auxílio de chaves taxonômicas disponíveis e com o auxílio de especialistas. Após a identificação de cada indivíduo, uma amostra de tecido foi retirada e o espécimen foi depositado como testemunho na coleção de peixes do INPA.

O DNA foi extraído através de técnicas padronizadas descritas em Alves-Gomes *et al* 1995. O DNA total (mitocondrial + genômico) foi extraído com um tampão à base de SDS na presença de proteinase K e RNase e purificado através de duas extrações com fenol equilibrado, duas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e uma com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A

concentração das amostras de DNA foram estimada através de comparações com marcadores moleculares de pesos conhecidos em eletroforese de géis de agarose a 0.8% com 0.5 µg/ml de brometo de etídio em seguida fotografado.

Uma vez extraído e checada a qualidade, o DNA de cada espécie foi acondicionado em tubos ependorf, com água ultra-pura (milli-q), rotulados e mantidos em freezers à -20 °C até uso posterior.

Fig.01 – Molécula de DNA com suas bases pareadas



Foram extraídas amostras de DNA de quarenta e um espécimens de peixes da ordem Gymnotiformes e trinta e sete Ordem de Siluriformes perfazendo um total de setenta e oito amostras de DNA dos quais quinze tiveram o DNA descrito nos resultados preliminares.

A tabela 01 abaixo indica os espécimens da ordem Gymnotiformes e Siluriforme que foram coletados e dos quais foram extraídos os DNAs com suas respectivas localidades.

Nº	ESPÉCIMENS DA O. GYMNOTIFORMES	Local da Coleta	Nº	ESPÉCIMENS DA O. SILURIFORME	Local da coleta
01	<i>Adontosternachus cf. balenops</i>	I. Marchantaria	01	<i>Astrodoros sp.</i>	Tarumã
02	<i>Adontosternachus sp.</i>	I. Marchantaria	02	<i>Astrodoros sp.</i>	Tarumã
03	<i>Adontosternachus sp.</i>	Rio Madeira	03	<i>Bunocephalus sp.</i>	I. Marchantaria
04	<i>Adontosternachus balaenops</i>	Rio Madeira	04	<i>Hassar sp.</i>	I. Marchantaria
05	<i>Apteronotus albifrons</i>	Rio Madeira	05	<i>Hypoptopoma sp.</i>	I. Marchantaria
06	<i>Apteronotus bonaparti</i>	I. Marchantaria	06	<i>Imporfinis pastos</i>	Rio Madeira
07	<i>Brachyhypopomus brevirostris</i>	Boa Vista	07	<i>Loricariichthys acatus</i>	Tarumã
08	<i>Brachyhypopomus brevirostris</i>	Rio Madeira	08	<i>Loricariichthys acatus</i>	Tarumã
09	<i>B. cf. pinnicaudatus</i>	Janauacá	09	<i>Microglanis parahybae</i>	Rio Madeira
10	<i>Brachyhypopomus sp.</i>	Rio Madeira	10	<i>Microglanis sp.</i>	I. Marchantaria
11	<i>Eigenmannia cf. macrops</i>	Boca - Tarumã	11	<i>Microglanis sp.</i>	I. Marchantaria
12	<i>Eigenmannia sp.</i>	Boca - Tarumã	12	<i>Microglanis sp.</i>	I. Marchantaria
13	<i>Eigenmannia sp.</i>	I. Marchantaria	13	Não identificado	I. Marchantaria
14	<i>Gymnotus aguilaris</i>	Rio Madeira	14	Não identificado	I. Marchantaria
15	<i>Gymnotus carapo</i>	Uruguai	15	<i>Parauchenipterus sp.</i>	Lago - Catalão
16	<i>Gymnotus cf. aguilaris</i>	Rio Madeira	16	<i>Paulicea sp.</i>	I. Marchantaria
17	<i>Rabinolichops cf. esatwardi</i>	Lago- Janauacá	17	<i>Pimelodella sp.</i>	Rio Madeira
18	<i>Ranphictis rostratus</i>	Lago - Catalão	18	<i>Pimelodus cf. biochii</i>	I. Marchantaria
19	<i>Steatogenys elegans</i>	Tarumã	19	<i>Pimelodus cf. blochis</i>	I. Marchantaria
20	<i>Steatogenys sp.</i>	I. Marchantaria	20	<i>Pimelodus sp.</i>	I. Marchantaria
21	<i>Sternachella sp.</i>	Tarumã	21	<i>Pimelodus sp.</i>	I. Marchantaria
22	<i>Sternachella sp.</i>	I. Marchantaria	22	<i>Pimelodus sp.</i>	I. Marchantaria
23	<i>Sternacogiton sp.</i>	I. Marchantaria	23	<i>Pimelodus sp.</i>	I. Marchantaria
24	<i>Sternacohynchus mormyrus</i>	I. Marchantaria	24	<i>Pseudoloricaria sp.</i>	Tarumã
26	<i>Sternacorynchus cf. mormyrus</i>	I. Marchantaria	25	<i>Pseudostegophilus murinus</i>	I. Marchantaria
21	<i>Sternacohynchus sp.</i>	I. Marchantaria	26	<i>Pterodoros sp.</i>	I. Marchantaria
			27	<i>Pterodoros sp.</i>	I. Marchantaria
			28	<i>Pterodoros sp.</i>	I. Marchantaria
			29	<i>Pterodoros sp.</i>	I. Marchantaria
			30	<i>R. cf. lanceolata</i>	Janauacá
			31	<i>Rineloricaria cf. formosa</i>	Tarumã
			32	<i>Rineloricaria cf. formosa</i>	I. Marchantaria
			33	<i>Rineloricaria formosa</i>	Tarumã
			34	<i>Stergophilus sp.</i>	Tarumã

	35	<i>Thpbbelus</i> sp.	Rio Madeira
	36	<i>Vandellia</i> sp.	I. Marchantaria

Tabela 01 – Espécimens coletados dos quais foram extraídos seus DNAs. No Brasil a maioria pertence ao Estado do Amazonas (Rio Madeira, Lagos do Catalão e Janauacá, Boca do Tarumã, Tarumã, Ilha da Marchantaria).

Mecanismo de eletroforese e análise do gel : Numa eletroforese, fez-se o DNA da amostra migrar em um campo elétrico através de uma matriz porosa. Durante o processo de extração de DNA tanto a agitação mecânica das amostras como a atuação de enzimas causam fragmentação do DNA liberado das células. Nas figuras 02 e 03 pode-se visualizar dois géis de agarose com amostras de DNA no qual pode-se notar que a maioria das amostras apresentam uma banda definida de maior peso molecular assim como fragmentos de tamanho variado que conferem a algumas faixas das figuras um aspecto difuso. As amostras de DNA foram inoculadas no lado esquerdo e a migração se deu no sentido esquerda para direita.

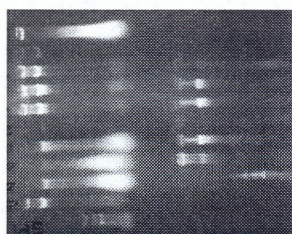


Figura 02 - Gel de agarose no qual foi verificada a qualidade do DNA de espécimens. Os números seguir indicam o espécimen na tabela 01 e a letra correspondente a ordem ao qual pertence, siluriforme (S) e Gymnotiforme (G). A primeira coluna mostra o DNA dos espécimens (de cima p/ baixo) 4G, 8S, 15G, 1S, 7G, 8G, 7S, 19G, 24S, 34G e marcador molecular. A Segunda coluna (de cima p/ baixo) contém os espécimens 23G, 11G, 17S, 33S, 30S, 9G e marcador molecular. A maioria das amostras possuem DNA de alto peso molecular.

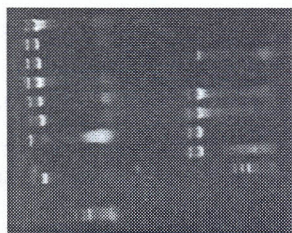


Figura 03 – Gel de agarose com as amostras de DNA dos espécimens das ordens gymnotiformes (G) e siluriformes (S). Os da primeira coluna (de cima p/ baixo) 18G, 24G, 25G, 19S, 21G, 3G, 10G, 16G, 12G, 14G e marcador molecular. Na segunda coluna têm-se os

O DNA foi extraído com sucesso dos representantes das duas ordens estando em boas condições para trabalhos futuros. Desta forma, foi iniciado um banco de DNA do INPA que futuramente pode se desenvolver num projeto maior, ligado às coleções e incluir outros tipos de organismos (inclusive invertebrados); e finalmente, o material coletado será usado para iniciar um estudo sobre genética populacional com marcadores moleculares em gymnotiformes e siluriformes, comparando populações de igarapés (afluentes) de margens opostas dos rios Negro e Solimões. As análises de DNA se mostram importantes no contexto da pesquisa, principalmente no que concerne a análises de filogenia, populações, clonagem de genes, de biologia molecular, de fluxo gênico e biogeografia.

ALVES-GOMES, J. A.; ORTI, G.; HAYGOOD, M.; HEILIGENBERG, W. and MEYER, A. Phylogenetic analysis of the south american electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology And Evolution* (1995), 12(2): 298-318.;

BEIGUELMAN, B. *Citogenética Humana*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1982. p12.

FINK, S. AND FINK, W. 1981. Interrelationships of the ostariophysan fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society*. (1981), 72: 302.

LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. 2ª edição. São Paulo: Editora Sarvier. p242 e p612.

MOLLER, P. *Electric Fishes History and behavior*. 1ª edição. London, USA: Editora Chapman & Hall. p282 e p440.

STRYER, L. *Bioquímica*. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1988. p59-7.