

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENIA DOS GENES DE *Idh-a* e *Idh-b* EM DUAS ESPÉCIES CONGÊNERES DE CICLÍDEOS DA AMAZÔNIA, *Astronotus ocellatus* E *Astronotus crassipinis*

Nayara Sousa CASTRO¹; Vera Maria Fonseca de Almeida e VAL²

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ² Orientadora CBIO/INPA

1. Introdução

A bacia amazônica abrange uma fauna de peixes rica e diversificada, que desenvolveu inúmeras adaptações às mudanças ambientais. Os genes das enzimas envolvidos no metabolismo glicolítico anaeróbico tais como *Idh-a* e *Idh-b*, estão diretamente ligados ao desenvolvimento de adaptações térmicas e a variações extremas nos níveis de oxigênio (Val *et al.*, 2004; Val, 1993; Almeida-Val *et al.*, 1999a). A caracterização parcial desses genes, através da obtenção de sequências de nucleotídeos e aminoácidos e sua relação com a adaptação de espécies submetidas a variações ambientais são os principais objetivos deste estudo, com as espécies congêneres *Astronotus ocellatus* e *Astronotus crassipinis*.

2. Material e Métodos

Foram utilizados três indivíduos de cada espécie, provenientes da natureza do trecho Coari-Manaus. Amostras de músculo branco foram usadas para a extração de DNA genômico, seguindo a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001) e extração de RNA total com *TRIZOL® Reagent* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante e síntese de cDNA, segundo as instruções do fabricante do kit Revertaid H-15T strand cDNA Synth (Fermentas). Para avaliação da integridade do DNA e RNA 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 os primers (*Idh-b* 1F, 1R) em TM° 51°C e com os primers (*Idh-a* 2F, 2R) em TM° 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 as sequências 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>>). As análises filogenéticas foram conduzidas através do software MEGA 5.0 pelos métodos de Máxima Parcimônia e Neighbor Joining (Tamura *et al.*, 2011).

3. Resultados e Discussão

Foram sequenciados fragmentos com cerca de 500 nucleotídeos de *Idh-b* e *Idh-a*. O sequenciamento foi realizado em duplicada com os primers (forward e reverse) de três indivíduos por espécie. Com a caracterização parcial da região do gene *Idh-b* foram identificados 51 nucleotídeos correspondentes à parte do primeiro éxon de *Idh-b*, 108 nucleotídeos do segundo éxon, 84 nucleotídeos do terceiro éxon e 91 nucleotídeos do íntron entre o éxon 2 e 3 em *Astronotus crassipinis*. Já na espécie *Astronotus ocellatus*, foram identificados 83 nucleotídeos, correspondente ao terceiro éxon e 63 nucleotídeos da região codificadora posterior, semelhante a sua espécie congênera *A. crassipinis*, mas não foram identificadas as outras regiões, o que sugere futuras análises (Figura 1).

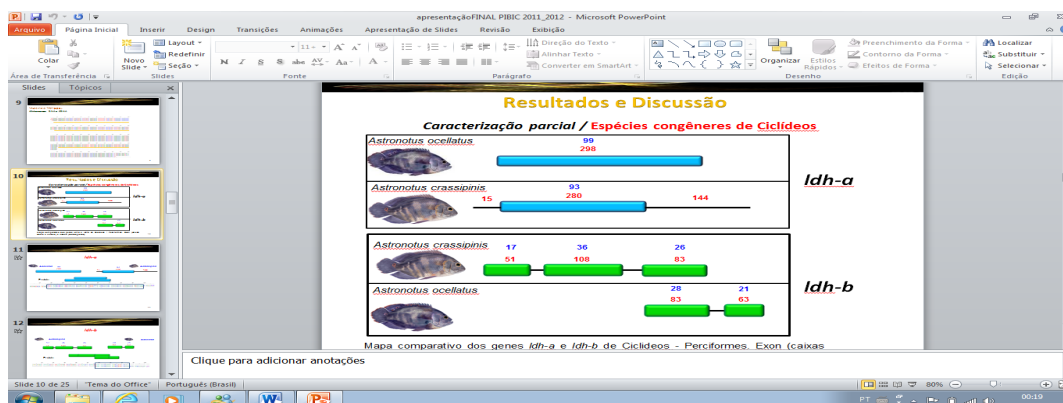


Figura 1. Mapa genético comparativo do gene de *ldh-b* de duas espécies congêneras de Ciclêdeos (Perciformes). Éxons (caixas verdes) e introns (barras pretas) tamanhos em número de pares de base (pb) são dadas acima da respectiva representação gráfica (em vermelho). Numeração em azul acima (números de aminoácidos de cada éxon).

entre os dois genes, justificando pelas substituições nos domínios conservados dos genes, bem como, a visível separação entre as ordens causada, principalmente, pelas substituições (Met55Iso) e (Ser76Hist) no gene de *ldh-b*, por exemplo. A segunda árvore também construída com base no alinhamento de aminoácidos entre os genes *ldh-a* e *ldh-b* de espécies de Perciformes e Characiformes amazônicos e representantes de outras ordens de clima Temperado, Tropical e Sub-tropical, mostra dois grandes grupos, um formado por espécies com gene *ldh-a* e outro grande grupo formado para *ldh-b* justificado pelas substituições (Met13Ala, Arg41Lis, Leu42Val, Iso42Val, Val49Ala) (Figura 4). Apesar dos genes apresentarem elevado nível de conservação e poucas substituições entre si, àquelas encontradas estão ligadas diretamente com a diferenciação entre os genes e possivelmente, foi um mecanismo evolutivo de adaptação das espécies amazônicas. Estudos com o peixe de clima temperado *Fundulus heteroclitus* mostrou que mudanças nas sequências de DNA foram determinantes para provocar adaptações à temperatura (Pierce e Crawford 1997), além de outros trabalhos que mostram dados semelhantes em Perciformes (Holand *et al.*; 1997; Somero 2004, Jons e Somero 2004; Edmunds 2009).

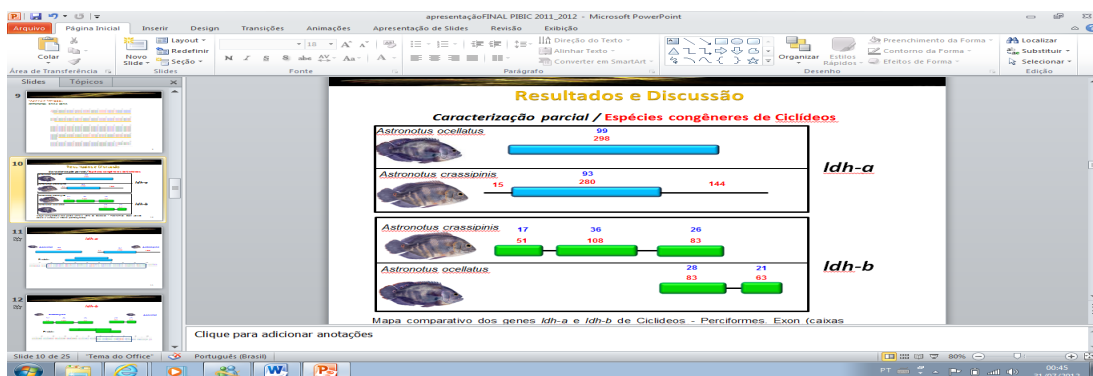


Figura2. Mapa genético comparativo do gene de *ldh-a*. Éxon (caixas azuis) e intron (barras pretas) tamanhos em número de pares de base (pb) são dadas acima da respectiva representação gráfica (em vermelho). Numeração em azul acima (números de aminoácidos de cada exon).

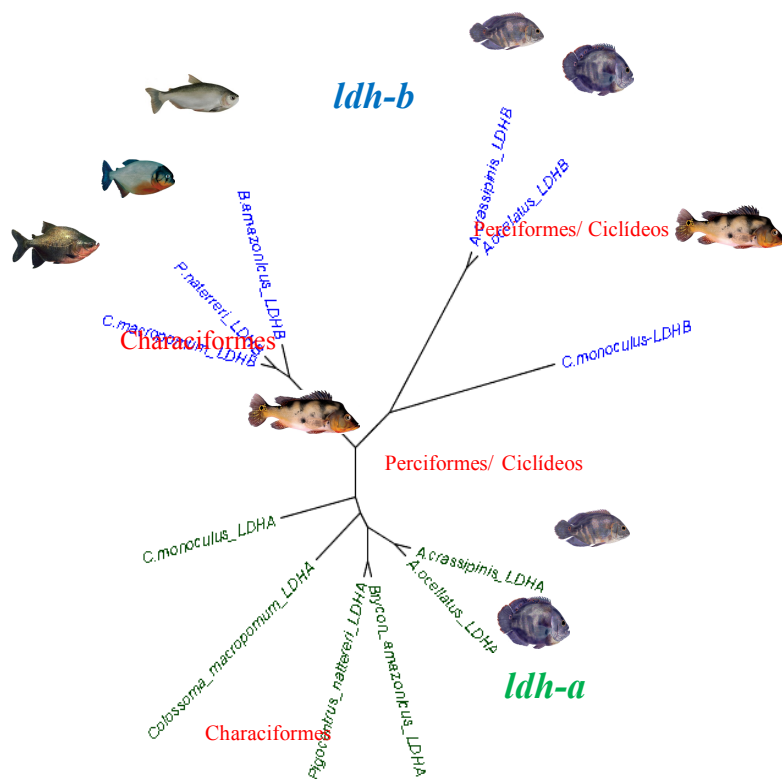


Figura 3. Árvore filogenética 1: Gene *ldh-a* e *ldh-b*. Espécies amazônicas



Figura 4. Árvore filogenética 2: Gene *ldh-a* e *ldh-b*

4. Conclusão

O sequenciamento de parte dos genes e identificação de exons e introns, bem como as substituições de aminoácidos em regiões conservadas, são informações importantes em nível molecular que aliadas com análises futuras e caracterização completa dos genes nos oferecerão esclarecimentos sobre o papel que a enzima de LDH desempenha na adaptação térmica e na aclimatação de espécies de diferentes tipos de clima e as espécies de peixes amazônicos.

5. Referências

- 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.
- Edmunds, R.C. 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.
- 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 *Sphyræna*) 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.
- 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.
- Larkin, M.A. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-2948.
- Pierce, V.A; Crawford, D.L. 1997. Phylogenetic Analysis of Glycolytic Enzyme Expression. *Science*, 276: 256–259.
- 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.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,
- 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.
- Val, A.L; Castro-Pérez, C.A; Almeida-Val, V.M.F. 2004. UV: *An environmental challenge for fish of the amazon*. *International Congress on the Biology of Fish*. Tropical Hotel Resort, Manaus Brazil, August 1–5.