INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – GCBEv

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA HIPÓFISE DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*) EM FASE REPRODUTIVA E NÃO REPRODUTIVA

Marcos Prado Lima

Manaus - AM
2009

MARCOS PRADO LIMA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA HIPÓFISE DE PIRARUCU *(Arapaima gigas)* EM FASE REPRODUTIVA E NÃO REPRODUTIVA

Orientador: Adalberto Luis Val
Co-orientadora: Mônica S. Ferreira Nozawa
Apoio financeiro: CNPq N^0 553322/2005

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus - AM
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

L732 Lima, Marcos Prado
Análise da expressão gênica diferencial na hipófise de pirarucu (*Arapaima gigas*) / Marcos Prado Lima.--- Manaus : [s.n.], 2009.
xv, 106 f. : il.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2009
Orientador : Adalberto Luis Val
Co-orientador : Mônica S. Ferreira Nozawa
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Pirarucu. 2. Genes. 3. Crescimento. 4. Reprodução. I. Título.

CDD 19. ed. 597.50415

SINOPSE

O presente trabalho avaliou o perfil de expressão gênica da hipófise de *Arapaima gigas*, a espécie mais promissora para a piscicultura em regime intensivo na Amazônia. As poucas informações sobre os mecanismos genéticos que atuam no crescimento e reprodução dessa espécie têm dificultado sua criação em cativeiro, aumentando a pressão sobre as populações naturais. Para avaliar o perfil de expressão gênica, foram construídas quatro bibliotecas de cDNA de indivíduos machos adultos, machos jovens, fêmeas adultas e fêmeas jovens de *A. gigas* que, após seqüenciadas, possibilitaram a identificação de genes diferencialmente expressos nas quatro condições analisadas, sendo que oito desses genes atuam na ligação, inibição ou síntese de hormônios envolvidos no crescimento e reprodução de *A. gigas*.

Palavras-chave:

Pirarucu, genes, crescimento, reprodução

Dedico às minhas mães ***Fátima, Vicência e Maria Portela*** *(in memorian)*

Por tudo que fizeram por mim ao longo da vida e por me apoiarem incondicionalmente na busca dos meus sonhos. Vocês me mostraram quais valores são realmente prioritários nessa vida. Meu amor por vocês é imensurável e incondicional...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu o dom da vida e a inteligência necessária para estudar e conhecer detalhes de sua obra-prima: a vida. A Nossa Senhora Aparecida pelo amparo e proteção durante os anos longe de casa.

Às minhas mães Fátima, Vicência e Maria Portela *(in memorian)* por tudo que fizeram por mim. Por terem ficado ao meu lado quando decidi deixar meu emprego em Santarém para me preparar para a prova de mestrado. Durante esses dois anos de saudade, vocês foram e continuam sendo meu maior estímulo, meu sustento, meu porto seguro. O amor de vocês é o que tenho de mais precioso nessa vida!

Ao meu irmão, Marcelo Prado por ter se alegrado comigo durante minha conquista, pelo estímulo e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Adalberto Val, pelo apoio incondicional e pela confiança em mim depositada ao longo desses dois anos no laboratório. Observando seu exemplo de cientista, percebi o verdadeiro significado das palavras: ética, dedicação e amor a Amazônia. Para mim, você sempre será um exemplo de educador e cientista. Obrigado Dr. Adalberto!

À Dra. Vera Val, pelo incentivo, amizade e confiança. Obrigado por ter me proporcionado a realização de cursos em São Paulo, Campinas e Salvador. Sua luta em defesa da preservação da Amazônia é um exemplo e um caminho que deve ser seguido por todos os Amazônidas. Obrigado por sua sensibilidade e por muitas vezes ter me abraçado não apenas como orientadora, mas como mãe.

À Dra. Mônica Nozawa pela co-orientação e ao Dr. Sérgio Nozawa que, mesmo não sendo co-orientador, sempre esteve presente nos momentos que precisei, seja tirando dúvidas sobre as técnicas moleculares ou debatendo os minuciosos mecanismos de expressão gênica. Obrigado por tudo Sérgio!

Ao Dr. Rubens Honda pela colaboração durante as coletas no município de Fonte Boa-AM. Rubão temos muita história pra contar...

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do INPA, pelo companheirismo, pelas inúmeras discussões científicas às quintas-feiras e no dia-a-dia. Especialmente à Christiane, Katherine, Angélica, Raquel, Daiani, Sylvia, Carol, Ana Helena, Ramon, Alzira e Rafael.

À Nazaré Paula (Naza) pelo auxílio na preparação das excursões, pela disponibilidade em colaborar no que estivesse ao seu alcance e pelos conselhos nos momentos de incertezas pessoais e profissionais. Obrigado Naza!

Aos colegas do Laboratório de Expressão Gênica do Centro Universitário Nilton Lins, especialmente Kacio, Frida, Zizi, Nayara e Elen pela ajuda durante a realização das atividades no laboratório e por tantos momentos de descontração.

A Danival Freitas pelos incentivos nos momentos difíceis. Obrigado pelas discussões sobre as técnicas moleculares e pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos amigos Joana, Israel, Liane e Alessandra que tornaram esses dois anos em Manaus mais prazerosos. A Elaine Cristina pela compreensão e apoio em tantos momentos difíceis; você foi fundamental para que eu não fraquejasse em meio a tantas incertezas.

A Gilcideya Soares pelo apoio, compreensão e companheirismo. Sem que eu percebesse, você foi ganhando importância na minha vida dia após dia, tornando-a mais alegre e feliz, tanto que hoje, você representa mais que uma amiga e namorada.

Aos colegas da turma de mestrado Adam, Leandra, Letícia e especialmente a Izaura. Admiro sua coragem, força de vontade e determinação, pois “desbravar” a Amazônia aos 60 anos de idade a faz merecer meu respeito e admiração.

A coordenação do programa de pós-graduação em Genética do INPA, especialmente Hercília, Alessandra e Dra. Vera Scarpassa, pelo apoio desde o primeiro dia de curso.

Ao Centro Universitário Niltons Lins pela utilização do Laboratório de Expressão Gênica para a realização de parte dos experimentos.

Ao INPA pelo apoio institucional e logístico e ao CNPq pelo financiamento do projeto e da bolsa de mestrado.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização deste sonho, inclusive aqueles que, infelizmente, tenha esquecido de citar. Muito obrigado a todos!

"Não se pode ensinar alguma coisa a alguém, pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si mesmo" (Galileu Galilei)

"Quem não valorizar pequenos progressos não conseguirá obter grandes progressos. Os grandes progressos são resultado da perseverante manutenção da força de vontade. Contudo, por maior que seja a força de vontade, se a pessoa não tiver sonhos elevados e grandiosos não conseguirá realizar grandes obras. O sonho faz a mente definir um rumo visando a sua realização; e a força de vontade possibilita-nos manter vivo o sonho e perseverar até sua concretização."

Masaharu Taniguchi

RESUMO

Arapaima gigas, conhecido na Amazônia como pirarucu, é considerado um dos maiores peixes de água doce do mundo, podendo chegar a três metros de comprimento e mais de 200 kg de peso. É a espécie mais promissora para a piscicultura em regime intensivo na Amazônia. Pertencente à ordem Osteoglossomorpha, *A. gigas* é considerada uma importante espécie devido a sua posição na base da filogenia dos teleósteos, sendo um elo entre os antigos peixes ósseos e os teleósteos derivados. Apesar de muito apreciado pela população, a escassez de informações relacionadas ao crescimento e à reprodução de *A. gigas* tem dificultado sua criação em cativeiro, resultando numa lacuna que necessita urgentemente de pesquisas que possam subsidiar com segurança a compreensão dos aspectos fisiológicos e genéticos da reprodução dessa espécie e possibilitar o desenvolvimento de técnicas artificiais de reprodução em cativeiro. Por isso, visando estudar a expressão gênica e identificar genes diferencialmente expressos em machos e fêmeas de *A. gigas* em fase reprodutiva e não reprodutiva, foram construídas quatro bibliotecas de EST's a partir da hipófise de indivíduos macho adulto, macho jovem, fêmea adulta e fêmea jovem de *A. gigas* provenientes do ambiente natural. Após o sequenciamento de 3.857 clones, foram encontrados 139 genes diferencialmente expressos nas quatro bibliotecas analisadas, sendo oito desses genes diretamente relacionados à reprodução e ao crescimento de *A. gigas* por atuarem como receptores hormonais em tecidos-alvo, com papel fundamental na regulação da homeostase do indivíduo por meio da ligação a diversos hormônios neurotransmissores. As diferenças observadas por meio da ontologia dos genes encontrados nas quatro bibliotecas nos permitem afirmar que em *A. gigas*, a expressão gênica ocorre de forma diferenciada entre adultos e jovens, mas de forma muito semelhante entre machos e fêmeas.

Palavras-chaves: pirarucu, genes, crescimento, reprodução.

ABSTRACT

Arapaima gigas, known as pirarucu in the Amazon, is considered one of the largest freshwater fish of the world and may reach three meters of the length and 200 kg of weight. It is the most promising species for intensive system farming in the Amazon. Belonging to order Osteoglossomorpha, *A. gigas* is considered an important species because its location in the base of the phylogeny of teleosts and a link between the old and derivate teleosts. Despite appreciated by Amazonians, *Arapaima* is poorly known as regard its growth and reproduction making difficult its establishment in captivity. Clearly, more information is need to safely promote the understanding of genetic and physiological aspects about reproduction of this species and enable the development of artificial techniques of captivity breeding. Therefore, our purpose was to study the gene expression and identify genes differentially expressed in males and females of *A. gigas* in reproductive and non-reproductive phases. We produced four libraries of EST from pituitary of adult male, young male, adult female and young female of *A. gigas* from the natural environment. After sequencing 3857 clones, 139 genes were found differentially expressed among the four libraries analyzed, eight of these genes directly related to reproduction and growth of *A. gigas* by acting as hormone receptors in target tissues, with role in the regulation of individual homeostasis and by connecting to various neurotransmitters hormones. The differences observed by the ontology of found genes allow us to affirm that gene expression in *A. gigas* occurs in different forms between adults and young, but very similar forms between males and females.

Keywords: pirarucu, genes, growth, reproduction.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO..... 16

1.1 - *Arapaima gigas*..... 16

1.2 - Hipófise de osteoglossídeos..... 20

1.3 - Fisiologia molecular da reprodução em peixes..... 22

1.4 - Genôma e transcriptoma..... 24

1.5 - Bioinformática..... 26

2 – JUSTIFICATIVA..... 29

3 – OBJETIVOS..... 30

3.1 - Geral..... 30

3.2 - Específicos..... 30

4 – MATERIAL E MÉTODOS..... 31

4.1 - Coleta das amostras..... 31

4.2 - Extração e isolamento do RNAm..... 32

4.3 - *Pool* das amostras de RNAm..... 33

4.4 - Construção de bibliotecas de cDNA..... 34

4.5 - Síntese da fita simples de cDNA..... 36

4.6 - Síntese da fita dupla de cDNA..... 36

4.7 - Tratamento com proteinase K..... 37

4.8 - Digestão com Sfi I..... 38

4.9 - Ligação do cDNA ao vetor de clonagem..... 38

4.10 - Transformação em célula competente..... 38

4.11 - Seleção e estoque dos clones..... 39

4.12 - Mini-preparação do DNA plasmidial..... 39

4.13 - Seqüenciamento..... 40

4.14 - Análise das EST's obtidas..... 41

4.14.1 - Análise de qualidade de sequências (*Phred*)..... 42

4.14.2 - Clusterização (*Cap3*)..... 42

4.14.3 - Identidade das EST's..... 42

4.14.4 - Classificação das EST's de acordo com as categorias do *Gene Ontology*..... 43

4.14.5 - Padrão de expressão digital..... 44

5 – RESULTADOS..... 45

5.1 - Extração do RNAm..... 45

5.2 - Construção das bibliotecas de cDNA..... 46

5.3 - Análise das seqüências geradas..... 47

5.4 - Avaliação dos insertos clonados..... 48

5.5 - Perfil de expressão gênica..... 49

5.6 - Categorização dos genes..... 53

6 – DISCUSSÃO..... 62

7 – CONCLUSÕES..... 75

8 – PERSPECTIVAS FUTURAS..... 76

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 77

10 – ANEXOS..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de análises realizadas pela ferramenta BLAST..... 28

Tabela 2. Oligonucleotídeos do kit SMART cDNA Library Construction utilizado na construção das quatro bibliotecas de cDNA de *A. gigas*..... 37

Tabela 3. Número de seqüências geradas e índice de novidade médio das quatro bibliotecas de *Arapaima gigas*..... 48

Tabela 4. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Macho Adulto de *Arapaima gigas*..... 55

Tabela 5. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Macho Jovem de *Arapaima gigas*..... 56

Tabela 6. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Fêmea Adulta de *Arapaima gigas*..... 57

Tabela 7. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Fêmea Jovem de *Arapaima gigas*..... 58

Tabela 8. Genes expressos diferencialmente nas bibliotecas de cDNA e relacionados à reprodução e ao crescimento de *Arapaima gigas*..... 59

Tabela 9. Blast X dos oito genes envolvidos com a reprodução e o crescimento de *Arapaima gigas*..... 60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de *Arapaima gigas* ao lado do autor Marcos Prado Lima. Foto: Rubens Honda..... 16

Figura 2. Mapa da região Amazônica, mostrando área de ocorrência de *Arapaima gigas*..... 17

Figura 3. Localização da *sella túrcica* na base do diencéfalo, onde se encontra a hipófise de *Arapaima gigas*..... 21

Figura 4. Imagem de satélite do local de coleta, Lago Majoará..... 31

Figura 5. Ovário de uma fêmea adulta de *Arapaima gigas*..... 32

Figura 6. Representação esquemática da estratégia utilizada pelo kit Creator SMART cDNA Library Construction utilizado na construção das quatro bibliotecas de cDNA de *A. gigas*..... 35

Figura 7. Pipeline utilizado para anotação dos genes encontrados em *Arapaima gigas*..... 41

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), mostrando a integridade do RNAm extraído das hipófises de adultos de *Arapaima gigas.* O mesmo procedimento foi realizado para as amostras dos jovens..... 45

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do cDNA utilizado para a construção das bibliotecas de macho e fêmea adultas de *Arapaima gigas*..... 46

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do cDNA utilizado para a construção das bibliotecas de macho e fêmea jovens de *Arapaima gigas*..... 46

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) da digestão dos clones das bibliotecas de *Arapaima gigas*, confirmando o tamanho dos insertos entre 200 e 300 pb na maioria dos poços..... 47

Figura 12. Tipos de seqüências observadas nas quatro bibliotecas de *Arapaima gigas.*..... 48

Figura 13. Tamanho dos insertos encontrados nas quatro bibliotecas de *Arapaima gigas*..... 49

Figura 14. Freqüência dos genes classificados como diferencialmente expressos nas quatro bibliotecas de cDNA de *Arapaima gigas*. A variação de cor indica a freqüência do gene em cada biblioteca. Preto: muito freqüente; Cinza escuro: freqüência mediana; Cinza claro: pouco freqüente e Branco: não encontrado na biblioteca..... 50

Figura 15. Categorização da biblioteca de Macho Adulto de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology)..... 55

Figura 16. Categorização da biblioteca de Macho Jovem de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology)..... 56

Figura 17. Categorização da biblioteca de Fêmea Adulta de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology)..... 57

Figura 18. Categorização da biblioteca de Fêmea Jovem de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology)..... 58

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Autorização para coleta dos exemplares de *Arapaima gigas* utilizados na construção das bibliotecas de cDNA..... 93

Anexo B. Mapa do vetor pDNR-LIB utilizado na construção das bibliotecas de cDNA de *Arapaima gigas*..... 94

Anexo C. Processo biológico do gene Estrogen receptor, gerado pelo Gene Ontology..... 95

Anexo D. Processo biológico do gene Luteinizing hormone receptor, gerado pelo Gene Ontology..... 96

Anexo E. Processo biológico do gene Prolactin receptor, gerado pelo Gene Ontology..... 97

Anexo F. Processo biológico do gene Growth hormone receptor isoform 1, gerado pelo Gene Ontology..... 98

Anexo G. Processo biológico do gene Somatostatin receptor type 1 subtype A and B, gerado pelo Gene Ontology..... 99

Anexo H. Processo biológico do gene Follistatin, gerado pelo Gene Ontology..... 100

Anexo I. Processo biológico do gene Activin receptor IIB, gerado pelo Gene Ontology..... 101

Anexo J. Processo biológico do gene Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, gerado pelo Gene Ontology..... 102

Anexo L. Mapa metabólico do gene Receptor de Somatostatina (em azul) e do Receptor do Hormônio Luteinizante (em vermelho)..... 103

Anexo M. Mapa metabólico do gene Receptor do Hormônio de Crescimento..... 104

Anexo N. Mapa metabólico do gene Receptor de Prolactina (em vermelho).....105

Anexo O. Mapa metabólico do gene Receptor de Ativina IIB..... 106

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - *Arapaima gigas*

Arapaima gigas (Schinz, 1822) (figura 1), popularmente conhecido como pirarucu no Brasil e como paiche no Peru (Ochoa *et al*., 2005), é endêmico da bacia Amazônica e muito apreciado pela população. Até 1970, o pirarucu foi a espécie mais importante para o comércio de pescado na região, porém, devido ao grande esforço de pesca, os estoques naturais sofreram grande redução nas últimas décadas (Val & Honczaryk, 1995).

O pirarucu pertence a Ordem Osteoglossiformes, um dos grupos mais antigos dos teleósteos vivos que surgiram durante o período jurássico (Nelson, 1994; Lavoué & Sullivan, 2004). Para Nelson (1994), a ordem abrange seis famílias, 29 gêneros e cerca de 217 espécies. Na América do Sul são encontrados os gêneros *Arapaima* (*A. gigas*) e *Osteoglossum* (*O. bicirrhosum e O. ferreirai*) que ocorrem na região amazônica, nas bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia.

Figura 1. Exemplar de *Arapaima gigas* ao lado do autor Marcos Prado Lima. Foto: Rubens Honda.

As características filogenéticas de *A. gigas*, esqueleto e morfologia externa, diferem daquelas de todas as outras espécies de peixes, o que o classifica como “um fóssil vivo”, de fundamental importância para estudos comparativos sobre a evolução dos teleósteos (Scorvo-Filho *et al.*, 2004).

Segundo Salvo-Souza & Val (1990), a espécie *A. gigas* vive em lagos da região amazônica (figura 2), mas também pode ser encontrada em rios com baixa correnteza, margeados por mata espessa. De hábito alimentar carnívoro, o pirarucu alimenta-se de peixes, preferencialmente caracoídeos e loricariídeos (cascudos) (Val & Honczaryk, 1995; Imbiriba, 2001), mas também de moluscos e insetos aquáticos (Crescêncio, 2001; Imbiriba, 2001), sendo considerado um dos maiores peixes de água doce do mundo (Imbiriba, 2001). É a espécie mais promissora para a piscicultura em regime intensivo na região amazônica (Cavero *et al.*, 2003ab; Brandão *et al.*, 2006), pois suporta altas densidades de estocagem (Cavero *et al.*, 2002; Cavero *et al.*, 2003a), apresenta rápido crescimento, atingindo até dez quilos no primeiro ano de criação (Imbiriba, 2001; Pereira-Filho *et al*., 2003), chegando, na fase adulta, a três metros de comprimento e mais de 200 kg de peso (Imbiriba, 2001; Hrbek *et al.,* 2005). A maturação sexual ocorre do terceiro ao quinto ano de vida, com 1,60 a 1,70 metros de comprimento e cerca de 40 a 50 kg de peso, sendo que os ovos são depositados em ninhos e os machos é que ficam responsáveis pelos cuidados com a prole. Neste período apresentam dimorfismo sexual, onde o macho adquire coloração avermelhada mais intensa (Val & Honczaryk, 1995).

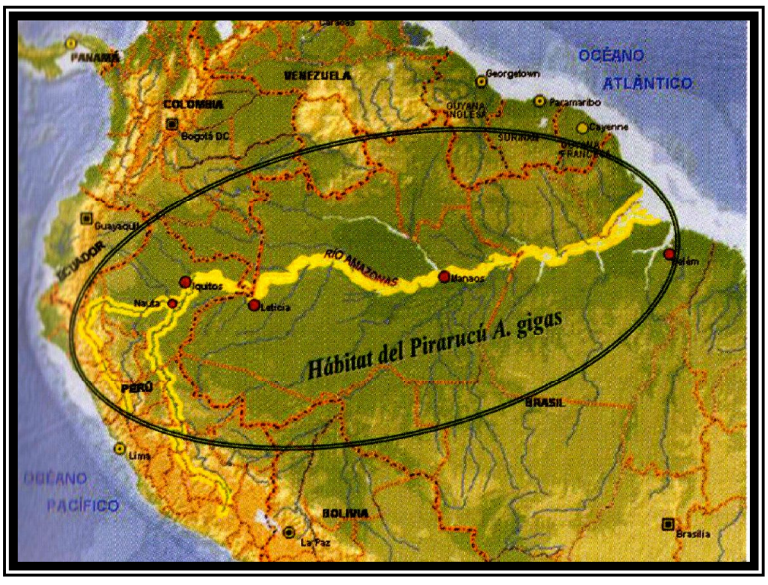


Figura 2. Mapa da região Amazônica, mostrando área de ocorrência de *Arapaima gigas*. Fonte: Ochoa *et al.* (2005).

Além dessas características, o pirarucu apresenta respiração aérea obrigatória, valendo-se de sua bexiga natatória modificada que permite a tomada de oxigênio diretamente do ar atmosférico (Crescêncio *et al.*, 2005; Brauner *et al*., 2004; Imbiriba, 2001), facilitando sua criação em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio (Salvo-Sousa & Val, 1990).

Experimentos prévios realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia indicaram que até o peso de aproximadamente sete gramas, o animal exibe respiração aquática. A partir disso, o pirarucu passa a retirar o oxigênio do ar atmosférico, fazendo a tomada de oxigênio por meio da bexiga natatória que é altamente vascularizada.

Durante uma expedição científica feita pelo navio científico *Alpha Helix* em 1976 a Amazônia, os pesquisadores Isaacks *et al.* (1977) e Bartlett *et al.* (1978) registraram simultaneamente a presença, em *A. gigas,* do inositol pentafosfato (IPP), um composto orgânico encontrado nos glóbulos vermelhos (eritrócitos) do sangue de aves, onde atua como modulador da afinidade da hemoglobina com o oxigênio (Salvo-Souza & Val, 1990; Val, 2000). Esse achado representou uma grande descoberta, visto que para Val *et al.* (1991), o IPP havia sido descrito somente em pássaros e tartarugas, e sua ocorrência não era conhecida em outro organismo na natureza.

No período de um ano, Val *et al.* (1991) estudaram o IPP presente nos eritrócitos de pirarucu e constataram variações de sua concentração durante o primeiro ano de vida, em que o IPP aumentou lentamente até estabilizar-se quando os animais atingiram entre 1 e 1,5 m de comprimento.

Para Hrbek *et al.* (2005) e Farias *et al.* (2003), historicamente *A. gigas* compreendeu uma porção significativa da dieta dos povos que viviam próximos aos grandes corpos de água da Amazônia, tanto que no começo do século XVIII teve início a pesca comercial para satisfazer a demanda pelo bacalhau, importado. De acordo com Ochoa *et al.* (2005), o pirarucu goza de uma posição preferencial no comércio regional amazônico por aspectos qualitativos tais como o alto rendimento da carcaça, alta demanda, alto valor nutricional de sua carne, bom sabor do filé e grande aceitação nos mercados da Amazônia.

Imbiriba (2001) e Val & Honczaryk (1995) citam que a comercialização da carne do pirarucu ocorre principalmente na forma de mantas que podem ser frescas,

congeladas ou salgadas, sendo este o principal meio de preservação e comercialização do produto, daí a denominação de “bacalhau brasileiro”. Além da deliciosa carne, praticamente desprovida de espinhas, aproveita-se ainda do animal as escamas, a língua óssea, os ovos e a pele, contribuindo para o incremento econômico do cultivo dessa espécie.

O pirarucu é uma espécie vulnerável (Ochoa *et al.*, 2005), pois precisa emergir a intervalos regulares de 4 a 5 minutos para respirar (Val & Honczaryk, 1995). É nesse momento que os pescadores, munidos de arpão ou fisga, capturam o peixe. Apesar das medidas de proteção implantadas pela legislação brasileira, Imbiriba (2001) afirma que a pesca do pirarucu está colocando em risco a sobrevivência da espécie, pois é praticada de forma predatória e com a captura de exemplares jovens, chamados de “bodecos”, prejudicando de maneira sensível os estoques naturais. De acordo com Ono *et al.* (2004), a produção de alevinos e o cultivo em escala industrial contribuirá para a diminuição da pesca predatória e criminosa que ainda hoje sofre o pirarucu.

Como conseqüência da super exploração dos estoques naturais, em 1975 *A. gigas* tornou-se uma das poucas espécies de peixe listadas no Anexo II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção (CITES). Em 2001 o governo brasileiro proibiu a pesca e a comercialização de *A. gigas* proveniente de seu ambiente natural, exceto na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, localizada na cidade de Tefé - AM, o que não impediu a pesca ilegal e a sua venda em mercados e restaurantes (Farias *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, *A. gigas* tornou-se o foco de muitos estudos envolvendo diversas áreas, tais como: o cultivo em cativeiro (Cavero *et al.*, 2002; Pereira-filho *et al*., 2003; Imbiriba, 2001; Scorvo-Filho *et al.*, 2004; Ono *et al.*, 2004), alimentação (Crescêncio, 2001; Cavero *et al.*, 2003c, Crescêncio *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Gandra *et al*., 2007), crescimento (Martinelli & Petrere Jr, 1999; Cavero *et al.*, 2003ab), estresse (Cavero *et al*., 2004; Brandão *et al*., 2006; Gomes *et al*., 2006), fisiologia e bioquímica (Salvo-Souza & Val, 1990; Val *et al.*, 1991; Brauner *et al.*, 2004), variabilidade genética (Farias *et al.*, 2003; Marques, 2003; Hrbek *et al*., 2005) e filogenia (Lavoué & Sullivan, 2004).

Farias *et al.* (2003) realizaram estudos em *A. gigas* utilizando 14 marcadores moleculares microssatélites para determinar níveis de variabilidade genética das populações da bacia amazônica e registraram um alto nível de variabilidade intra-populacional, o que significa, segundo os autores, que a população estudada tem condições genéticas satisfatórias para se manter no ambiente. Da mesma forma, Marques (2003) utilizando espécies da bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia, por meio da técnica RAPD-PCR, constatou a ocorrência de apenas uma população na região de coleta, com variabilidade intrapopulacional significativa.

Estudos recentes realizados por Hrbek *et al*. (2005), visando a conservação genética de populações de *A. gigas* na bacia amazônica, utilizaram os segmentos NADH1 e ATPase do DNA mitocondrial e constataram uma diminuição no tamanho efetivo das populações e uma homogeneidade genética entre as populações, além da ocorrência de deriva genética e “bottleneck”. Segundo os autores, a criação de reservas biológicas como a de Mamirauá, poderia contribuir para a redução da exploração das populações naturais e atuar como fontes emigrantes como num modelo de metapopulação, contribuindo para a mudança do atual cenário por meio de um repositório de diversidade genética.

1.2 – Hipófise de osteoglossídeos

A hipófise ou glândula pituitária é o órgão de síntese, acúmulo e liberação de hormônios que atuam em importantes processos fisiológicos dos vertebrados, tais como reprodução, desenvolvimento, crescimento, osmorregulação, metabolismo, entre outros. O controle hormonal nessas funções é realizado pelo sistema nervoso central (SNC), por meio de neuro-hormônios reguladores que estimulam ou inibem a liberação de hormônios adeno-hipofisários, os quais, por sua vez, atuam em diversas outras glândulas, gônadas e demais células ou tecidos efetores (Borella *et al.*, 2006).

De acordo com Amar & Weiss (2003), a hipófise localiza-se dentro da fossa hipofisária, um compartimento ósseo-fibroso localizado próximo da região central da base do crânio, numa depressão do osso esfenóide chamada de *sella túrcica* (figura 3). Está presente em todos os vertebrados, intimamente associada ao hipotálamo

através de prolongamentos de neurônios e de um sistema vascular portal, ambos de vital importância para o controle neuronal. Em todos os vertebrados compõem-se de dois tipos de tecidos com origens diferentes: a adeno-hipófise, tecido glandular endócrino originado por uma evaginação ectodérmica do teto da cavidade bucal embrionária, chamada de bolsa de Rathke, e a neuro-hipófise de origem nervosa, proveniente de um invaginação do processo ventral do diencéfalo (Borella *et al.*, 2006).

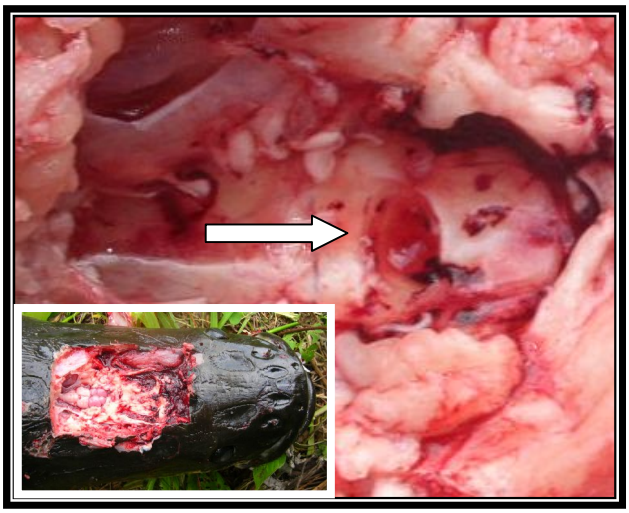


Figura 3. Localização da *sella túrcica* na base do diencéfalo, onde se encontra a hipófise de *Arapaima gigas*. Foto: Marcos Prado.

Para Nelson (1994), Osteoglossomorpha é considerado um importante grupo devido ao seu lugar na base da filogenia dos teleósteos, sendo um elo de ligação entre os antigos peixes ósseos e os teleósteos derivados. Para Borella *et al.* (2009), a hipófise de *A. gigas* apresenta características basais entre os antigos Actinopterigi e os demais teleósteos derivados. Borella *et al.* (2006) afirma que a hipófise dos osteoglossídeos, pirarucu (*A. gigas*) e aruanã (*Osteoglossum bicirrosum*), tem sua estrutura diferenciada dos demais teleósteos devido às seguintes características:

1) Apresenta uma única região adeno-hipofisária, ao contrário da adeno-hipófise dos teleósteos, que é subdividida em *pars distalis e proximalis*;

2) Pela presença de duas partes distintas da neuro-hipófise, sendo uma porção rostral, que se estende sobre a adeno-hipófise, não penetrando ou interdigitando-se com as células glandulares dessa região como nos demais teleósteos, e uma porção caudal, intensivamente interdigitada com a *pars intermedia*, à semelhança do que ocorre na hipófise dos teleósteos não osteoglossídeos, diferente do arranjo típico da hipófise dos outros vertebrados.

O estudo da hipófise visa, portanto, melhor compreender o controle endócrino dos processos fisiológicos dos animais, especialmente relacionados ao crescimento e ao sistema reprodutivo.

1.3 – Fisiologia molecular da reprodução em peixes

O processo reprodutivo dos peixes se inicia a partir do momento em que atingem a idade e o peso mínimo. Alterações ambientais como o fotoperíodo, a temperatura e, possivelmente as chuvas, são captadas através dos olhos, pineal, narinas e receptores cutâneos, que as convertem em sinais eletroquímicos e são transmitidos via neurônios sensoriais até o hipotálamo. Os fatores ambientais citados estimulam o hipotálamo a sintetizar e liberar o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que estimula as células gonadotrópicas na hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo estimulante (FSH), que via corrente sangüínea chega às camadas foliculares dos oócitos em desenvolvimento e na camada teca, convertendo o colesterol em testosterona (Nagahama, 1994; Blázquez *et al.,* 1998; Weltzien *et al.*, 2004).

Esta é transportada à camada granulosa, na qual é aromatizada a 17β-estradiol, o principal tipo de estrógeno, pela enzima aromatase, também sob influência do FSH. O 17β-estradiol age no fígado (via corrente sangüínea), estimulando a síntese da glicolipofosfoproteína (vitelogenina) que, também via corrente sangüínea, é capturada pelo oócito por micropinocitose (processo dependente de FSH), promovendo o crescimento do oócito e incorporação de vitelo.

É importante salientar que a detecção da vitelogenina no muco dos peixes tem sido sugerida como forma de diferenciação do sexo, pois na maioria dos peixes, como em *A. gigas*, não ocorre um dimorfismo sexual evidente e, além disso, a detecção da vitelogenina pode ser utilizada como forma de seleção para saber o estado de maturidade dos peixes (Moncaut *et al.*, 2003).

Na fase de vitelogênese, que é um processo pelo qual o citoplasma do oócito acumula substâncias de reserva para posterior utilização pela larva, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de 17β-estradiol e testosterona. Esse aumento inibe a síntese de FSH (*feed back negativo*) que juntamente com a ação do GnRH,

estimula a secreção hipofisária do hormônio luteinizante (LH) nas fases finais da vitelogênese. O LH estimula a camada teca do folículo a produzir 17α-hidroxiprogesterona, que é transportada à camada granulosa e convertida a 17α,20β-dihidroxy-4-pregnen-3-one ou 17α,20β-21-trihidroxy-4-pregnen-3-one pela enzima 20α-hidroxiesteróide-desidrogenase (Nagahama, 1994; Blázquez *et al*., 1998). O hormônio 17α-20β-dihidroxy-4-pregnen-3-one é conhecido como o hormônio indutor da maturação final e da ovulação na maioria dos peixes (Zohar & Mylonas, 2001).

Nos machos, o controle da síntese de esteróides é semelhante ao das fêmeas. O FSH e LH estimulam a esteroidogênese testicular e espermatogênese, sendo os andrógenos, testosterona e 11-cetotestosterona, produzidos pelas células de Leydig no tecido intersticial dos testículos. Esses hormônios gonadais são os mais importantes no desenvolvimento do testículo e das características sexuais secundárias nos machos (Haider, 2004).

Os efeitos de vários hormônios esteróides, tais como o estrógeno, testosterona, hormônio tireoidiano, retinóides, alguns ácidos graxos e prostaglandinas, são mediados por proteínas receptoras específicas, denominadas receptores nucleares que possuem papel fundamental na regulação da homeostase por meio da ligação a diversos hormônios (Krieg *et al.*, 2001).

De acordo com Krieg *et al.* (2001), os receptores nucleares agem na regulação dos níveis de RNAm, controlando a transcrição gênica e regulando a estabilidade dos RNAm. Para regular a transcrição em resposta a um hormônio ligante, os receptores nucleares devem realizar três funções básicas:

1 - O receptor deve ser ativado, o que geralmente envolve a ligação a uma pequena molécula específica do hormônio ligante, seguida da fosforilação ou desfosforilação do receptor em resposta ao padrão de sinalização celular, modulando também a atividade receptora, tal como a ligação ao DNA.

2 - O receptor geralmente liga-se a uma seqüência específica de DNA, denominada de elemento de resposta hormonal (ERH). Em alguns genes, o receptor não se liga diretamente ao DNA, mas interage com outra proteína de regulação gênica que se liga à seqüência específica de DNA. É essa proteína que liga o receptor ao DNA.

3 - O receptor deve sofrer uma mudança conformacional, como resultado da ação do ligante, da ligação ao DNA e da fosforilação. Essa mudança conformacional possibilita a ativação da transcrição.

A ativação da transcrição ou sua repressão é o resultado da interação do receptor com outras proteínas denominadas co-reguladores. Essas proteínas formam um complexo multi-proteico com o receptor, que interage com os componentes do aparato transcricional, provocando a acetilação das histonas (ou desacetilação) e interage com outros complexos multi-proteicos, facilitando o remodelamento da cromatina. Para induzir a transcrição de um gene, o complexo receptor-co-ativador deve facilitar a desespiralização da interação DNA-histona, que reprime a transcrição, e estimular ou estabilizar a formação de um complexo promotor transcricional (Krieg *et al.*, 2001).

1.4 – Genôma e transcriptoma

A partir das descobertas feitas por Mendel, ficou caracterizado que os princípios de crescimento, desenvolvimento e resposta dos organismos ao ambiente são determinados pela expressão dos genes, servindo como ponto de partida em diversos estudos. Dessa forma, uma das questões mais relevantes é entender como os elementos na seqüência de DNA são utilizados, sob que condições cada produto gênico é sintetizado e, uma vez sintetizado, qual a sua função no organismo (Liu & Cordes, 2004).

A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada como uma importante abordagem experimental para conhecer não somente a função gênica, mas também para compreender como os mecanismos moleculares estão relacionados com processos biológicos (Vedoy *et al.*, 1999).

Muitas vezes, principalmente quando se pretende estudar metabolismo, ao invés de ser realizado o seqüenciamento genômico de um organismo eucarioto, prefere-se realizar o seqüenciamento só das regiões gênicas (transcriptoma), utilizando informações oriundas do RNA mensageiro (RNAm) (Rodrigues, 2001). A representatividade das moléculas pode ser mantida pela construção de bibliotecas normalizadas que buscam manter todos os transcritos na mesma proporção com o

objetivo de não perder informações de transcritos raros. Outras estratégias, no entanto, também visam à preservação destes (Prosdocimi *et al.*, 2003).

Dessa forma, é construída uma biblioteca de DNA complementar (cDNA), representando o conjunto de RNAms de uma célula, que são clonados em vetores plasmidiais. Os insertos de cDNA presentes em tais vetores são então seqüenciados a partir de suas extremidades 5' ou 3', produzindo pequenas seqüências que irão representar pedaços dos genes expressos no momento da extração do mRNA das células presentes no tecido em questão. Esses pedaços seqüenciados têm em torno de 300 pb e representam "etiquetas de genes expressos", ou EST's (***E**xpressed **S**equence **T**ags*). A análise dos genes expressos é uma abordagem bastante utilizada na tentativa de entender o funcionamento do metabolismo dos mais diversos organismos (Prosdocimi *et al.*, 2003).

Além de permitir trabalhar apenas com seqüências expressas e identificar uma grande quantidade delas, por meio de comparações feitas com seqüências depositadas em bancos de dados, as EST's têm muitas outras aplicações; dentre elas podemos destacar sua utilização na construção de mapas físicos, na caracterização de grandes seqüências genômicas, na identificação de genes e de genomas e em tecnologias aplicadas à indústria farmacêutica (Zweiger & Scott, 1997). Essa estratégia é importante também para estudar o desenvolvimento dos organismos, produzindo bibliotecas de diferentes fases de desenvolvimento e observando quais genes são expressos em cada momento. Tal abordagem é importante para estudarmos como ocorre a expressão diferencial de genes em diferentes órgãos de um mesmo organismo, para que possamos entender a função desses órgãos ou como eles realizam funções conhecidas (Prosdocimi *et al.*, 2003).

O seqüenciamento de *EST's* é utilizado cada vez mais para anotação de seqüências genômicas de organismos eucariotos, pois podem dar evidências biológicas para a previsão de centenas de genes, desde que estes já sejam conhecidos em outros organismos, ou podem indicar a presença de novos genes (Vettore *et al.*, 2001).

Atualmente, vários organismos já tiveram seu genoma totalmente seqüenciado, ou estão em fase de conclusão. Dentre estes, podemos citar várias espécies de peixes que são utilizados como modelos em diversos estudos

comparativos, como *Danio rerio*, *Ictalurus punctatus*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* e *Oreochromis niloticus*.

Dentre as espécies acima citadas, o *zebrafish* ou peixe-zebra (*Danio rerio*), um pequeno teleósteo de 3 a 4 cm, se tornou o principal modelo experimental para o estudo do desenvolvimento de vertebrados (Anderson & Ingham, 2003) em diversas áreas da ciência, tais como: genética e genômica, desenvolvimento, teratologia, comportamento, toxicologia e neurociências (Vascotto *et al*., 1997).

Em 2001, o Instituto Sanger iniciou o sequenciamento do genoma total de *D. rerio*, porém seu genoma mitocondrial já está seqüenciado, servindo de base para estudos filogenéticos (Broughton *et al*., 2001). O estudo do genoma do *zebrafish* pode servir como um complemento funcional para o projeto genoma humano, o qual produziu enormes quantidades de seqüências, mas carece de informações funcionais para a maioria dos genes identificados (Dooley & Zon, 2000). Além disso, grandes segmentos dos cromossomos de *D. rerio* estão em sintenia com os cromossomos humanos e de camundongo, tanto que muitos genes apresentam alto grau de similaridade, quando comparados em suas seqüências (Barbazuk *et al*., 2000).

1.5 – Bioinformática

Os métodos computacionais para a identificação de genes transformaram-se em uma ferramenta cada vez mais importante nos últimos anos. Enquanto o ritmo de seqüenciamento de genomas cresceu com o surgimento dos seqüenciadores automáticos de DNA, a necessidade de métodos rápidos para a descoberta de genes tornou-se maior. A seqüência do genoma é justamente o começo de um grande esforço para compreender as funções de um organismo, e o primeiro e mais crítico passo desse processo é a identificação acurada de todos os genes e de suas proteínas associadas (Pertea e Salzberg, 2002).

Com esse propósito, foram desenvolvidos programas, tais como, *BLAST - Basic Local Alignment Search Tool-* (Altschul *et al.*, 1990), *Phred* (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998), *Phrap* (Green, 1999) e *Cap3* (Huang & Madan, 1999) que, respectivamente, identificam a similaridade das EST's obtidas com demais

seqüências disponíveis nos bancos de dados, analisam a qualidade, realizam o alinhamento das seqüências e geram os *contigs*.

Atualmente, a metodologia mais utilizada para inferir a função biológica de um gene (ou a proteína que ele codifica) é a procura de similaridade em banco de dados de DNA e proteínas. A ferramenta mais conhecida para esse propósito é o BLAST, que faz comparações entre pares de seqüências, procurando por regiões de similaridade local ou global.

O BLAST consiste de um conjunto de programas de busca de similaridade criado para explorar todos os bancos de dados de seqüências disponíveis em relação à proteína e ao DNA. Ele executa comparações de seqüências em pares, procurando regiões de similaridade local, ao invés de apenas alinhamentos globais ótimos entre as seqüências inteiras. Uma pesquisa do BLAST mostra como resultado uma lista de candidatos similares à seqüência submetida, juntamente com os alinhamentos dos segmentos correspondentes (Altschul *et al*., 1990).

Cada alinhamento tem um valor estimado de significância da similaridade observada na tentativa de se fazer a distinção entre alinhamentos que reflitam similaridade real ou ao acaso. Este valor, expresso na forma do *e-value* (*extreme value distribution*), se refere ao número de alinhamentos com pontuação igual ou maior à obtida que podem ocorrer simplesmente ao acaso no banco de dados utilizado na busca. Em outras palavras, o *e-value* expressa a probabilidade de que a similaridade entre as duas seqüências ocorra aleatoriamente. Exemplificando, um *e-value* de $1x10^{-6}$ significa que a chance de uma similaridade com a mesma pontuação surgir ao acaso seria de apenas uma em 10^6 sequências. Sendo assim, quanto menor o *e-value* maior a significância da similaridade entre as seqüências.

Para o cálculo do *e-value*, são considerados o tamanho das seqüências comparadas, a pontuação obtida para o alinhamento e ainda o tamanho do banco de dados onde foi efetuada a busca. Assim, o *e-value* obtido para uma busca em um banco de dados pequeno é proporcional ao calculado para um banco maior.

O BLAST, disponível no site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), apresenta cinco subtipos de ferramentas desenvolvidas para buscar similaridades entre seqüências de nucleotídeos e proteínas nos bancos de dados biológicos, conforme tabela 1.

Tabela 1. Tipos de análises realizadas pela ferramenta BLAST.

	SEQÜÊNCIA ENVIADA	SEQÜÊNCIA ALVO	DESCRIÇÃO
BlastN	Nucleotídeo	Nucleotídeo	Compara seqüência de nucleotídeos enviadas contra sequências de nucleotídeos do GenBank.
BlastP	Proteína	Proteína	Compara seqüência de aminoácidos enviadas contra sequências protéicas do GenBank.
BlastX	Nucleotídeo (traduzido)	Proteína	Traduz uma seqüência de nucleotídeos e compara contra sequências protéicas do GenBank.
tBlastX	Nucleotídeo	Nucleotídeo	Traduz uma seqüência de nucleotídeos nas seis possíveis fases de leitura e faz a análise contra o banco de nucleotídeos traduzido do GenBank.
tBlastN	Proteína	Nucleotídeo	Compara a seqüência da proteína contra o banco de nucleotídeos do GenBank traduzido nas seis fases de leitura.

Fonte: Modificado de Lopes (2005).

Além dessas ferramentas que permitem a análise de seqüências, aqueles que visam sua categorização também são importantes. Nesse contexto, a categorização de seqüências pelo *Gene Ontology* (www.geneontology.org*)* vem sendo amplamente utilizada.

O *Gene Ontology* foi iniciado a partir da necessidade da anotação do genoma de *Drosophila, Saccharomyces* e camundongo, em uma única linguagem que descrevesse os principais processos biológicos. Essa necessidade em comum resultou no desenvolvimento de um conjunto de termos inseridos em categorias, que se associam aos produtos gênicos gerados.

As principais categorias utilizadas pelo *Gene Ontology* são: (1) componente celular, (2) processo biológico e (3) função molecular. Nessa ferramenta, um gene pode ser anotado em mais de uma categoria, visto que este pode ter mais de uma função, estar envolvido em uma variedade de processos e/ou desempenhar essa função em várias localizações subcelulares (Hill *et al.*, 2001).

2 – JUSTIFICATIVA

A escassez de informações relacionadas aos aspectos fisiológicos e genéticos da reprodução do pirarucu tem dificultado sua criação em cativeiro, resultando numa lacuna que necessita urgentemente de pesquisas que possam subsidiar com segurança a compreensão da biologia reprodutiva, especialmente utilizando ferramentas modernas possibilitadas pelo grande avanço que a biologia molecular teve nos últimos anos.

As informações disponíveis sobre a reprodução do pirarucu são, na sua maioria, obtidas a partir de informações gerais e de pouca utilidade para o desenvolvimento de técnicas artificiais de reprodução. Investigações cientificamente embasadas ainda são insuficientes, mas fundamentais para que possamos melhorar o sucesso da reprodução artificial dessa espécie.

A construção de bancos de sequências de ESTs resultará na identificação de genes relacionados à reprodução, à diferenciação sexual e à síntese de hormônios em juvenis e adultos de *A. gigas*. Essas informações são importantes para discriminar as mudanças que ocorrem durante o processo reprodutivo dessa espécie, que sabidamente é singular. Informações desse tipo irão subsidiar, de forma mais segura, a produção e a conservação dessa importante espécie de peixe da Amazônia.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Geral

Identificar genes diferencialmente expressos em machos e fêmeas de *Arapaima gigas* em fase reprodutiva e não reprodutiva.

3.2 - Específicos

- Construir e seqüenciar bibliotecas de EST's de exemplares machos e fêmeas de *Arapaima gigas* em fase reprodutiva e não reprodutiva.

- Comparar as seqüências encontradas com aquelas disponíveis no banco de dados do NCBI e do Centro Universitário Nilton Lins[1].

- Categorizar a ontologia dos genes encontrados de acordo com a metodologia da ferramenta Gene Ontology.

- Selecionar genes relacionados ao crescimento e à reprodução de *A. gigas*.

[1] Banco de dados desenvolvido em MySQL com sistema em Java capaz de armazenar EST's de todas as espécies de peixes já depositadas em bancos de dados mundiais (i.e. NCBI) e comparar com sequencias de DNA trimadas, o resultado do BLAST (EST's disponívies no NCBI versus sequências geradas em nosso laboratório) produz uma tabela de comparações de sequências e disponibiliza a categoria de GO (gene ontology) de cada resultado do BLAST. Atualmente o banco possui mais de 1 milhão de EST's. Uso restrito em http://biolab.uniniltonlins.edu.br

4 – METODOLOGIA

4.1 - Coleta das amostras

O tecido-alvo foi a hipófise que, de acordo com Borella *et al*. (2006), é o órgão de síntese, acúmulo e liberação de hormônios que atuam em importantes processos fisiológicos nos vertebrados, como na reprodução, no desenvolvimento e no crescimento.

Os exemplares de pirarucu foram capturados nos meses de outubro de 2007 e novembro de 2008, períodos de seca na região Amazônica, em lagos naturais na cidade de Fonte Boa/AM, sob a licença do IBAMA N^{o} 16227-1 (anexo A). A área de coleta (figura 4) compreendeu um conjunto de lagos interligados conhecidos como Lago Majoará (S = 02^{o} 22’ 14.1” e W = 66^{o} 18’ 35.5”) que, apesar de pertencer à Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, está sob a proteção e fiscalização do Instituto de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa (IDS-FB) que promove o manejo sustentável de pesca na área.

Figura 4. Imagem de satélite do local de coleta, Lago Majoará. Fonte: *Google Earth.*

Um total de 24 pirarucus foi utilizado no estudo, sendo seis fêmeas adultas e seis machos adultos com comprimento mínimo de 1,5 metros, assim como seis fêmeas jovens e seis machos jovens com comprimento máximo de 1 metro.

Os peixes foram capturados por pescadores locais utilizando arpão e redes de pesca. Após a captura, foram sacrificados e a hipófise retirada ainda na margem do lago com auxílio de material cirúrgico especializado e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, os peixes foram pesados, medidos e tiveram seus ventres abertos para a correta distinção do sexo por meio da visualização das gônadas masculinas ou femininas que também foram fotografadas (figura 5).

Figura 5. Ovário de uma fêmea adulta de *Arapaima gigas*. Foto: Marcos Prado

As hipófises permaneceram congeladas até a chegada no Laboratório de Expressão Gênica do Centro Universitário Nilton Lins em Manaus-AM, onde foram transferidas para um freezer -80 ºC até o momento da extração do RNAm.

4.2 - Extração e isolamento do RNAm

O isolamento do RNAm das 24 hipófises foi realizado com o kit “FastTrack® MAG mRNA Isolation” da Invitrogen, seguindo as recomendações do fabricante. As hipófises inteiras foram colocadas em tubos de polipropileno tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, contendo 200 µL de tampão de lise, 5 µL de degradador de proteínas e maceradas com a ajuda de um homogeneizador orbital. Quando o tecido estava

totalmente homogeneizado com os reagentes, os tubos foram centrifugados por 5 min a 12000g, o sobrenadante foi retirado, transferido para um novo tubo e incubado em banho-maria a 65 ºC por 10 minutos.

Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo as esferas magnéticas previamente preparadas. Nesse momento, a cauda Poli T das esferas se liga à cauda Poli A do RNAm por complementariedade de bases e com o auxílio de uma estante magnética, as esferas já aneladas aos RNAm, migraram para a parede do tubo. O sobrenadante foi então removido e descartado, enquanto as esferas foram lavadas por três vezes em temperatura ambiente com 200 µL de tampão de lavagem disponibilizado pelo kit.

Após a última lavagem, foram adicionados 20 µL de água livre de RNAse e a mistura aquecida por 5 minutos a 37 ^{o}C. Utilizando novamente a estante magnética, o sobrenadante contendo o RNAm eluído foi coletado e utilizado para a síntese do cDNA.

Para confirmar a presença do RNAm no sobrenadante, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio (0.1 µg/mL) e visualizado em transiluminador com luz ultra-violeta (UV). Em seguida, as 24 extrações de RNAm foram quantificadas utilizando NanoDrop® (Thermo Scientific) para assegurar a correta concentração de RNAm.

4.3 - *Pool* das amostras de RNAm

Antes de iniciar a síntese da primeira fita de cDNA, cada um dos seis tubos contendo as extrações de RNAm dos pirarucus machos adultos teve 0,5 µg de RNAm retirados e misturados em um novo tubo, formando um *pool* de RNAm dos pirarucus machos adultos, o mesmo foi feito com as extrações das seis fêmeas adultas, dos seis machos jovens e das seis fêmeas jovens. Esse procedimento se justifica devido a possibilidade de existirem polimorfismos nas amostras coletadas, o que poderia interferir nos resultados.

4.4 - Construção de bibliotecas de cDNA

A partir da síntese da primeira fita de cDNA até a ligação ao vetor de clonagem, foi utilizado o Kit “Creator SMART cDNA Library Construction (Clontech/UK)”. O kit SMART (Switching Mechanism At 5’ end of RNA Transcript) foi desenvolvido para a construção de bibliotecas de cDNA a partir de pequena quantidade de RNA, de acordo com as recomendações do fabricante, conforme figura 6.

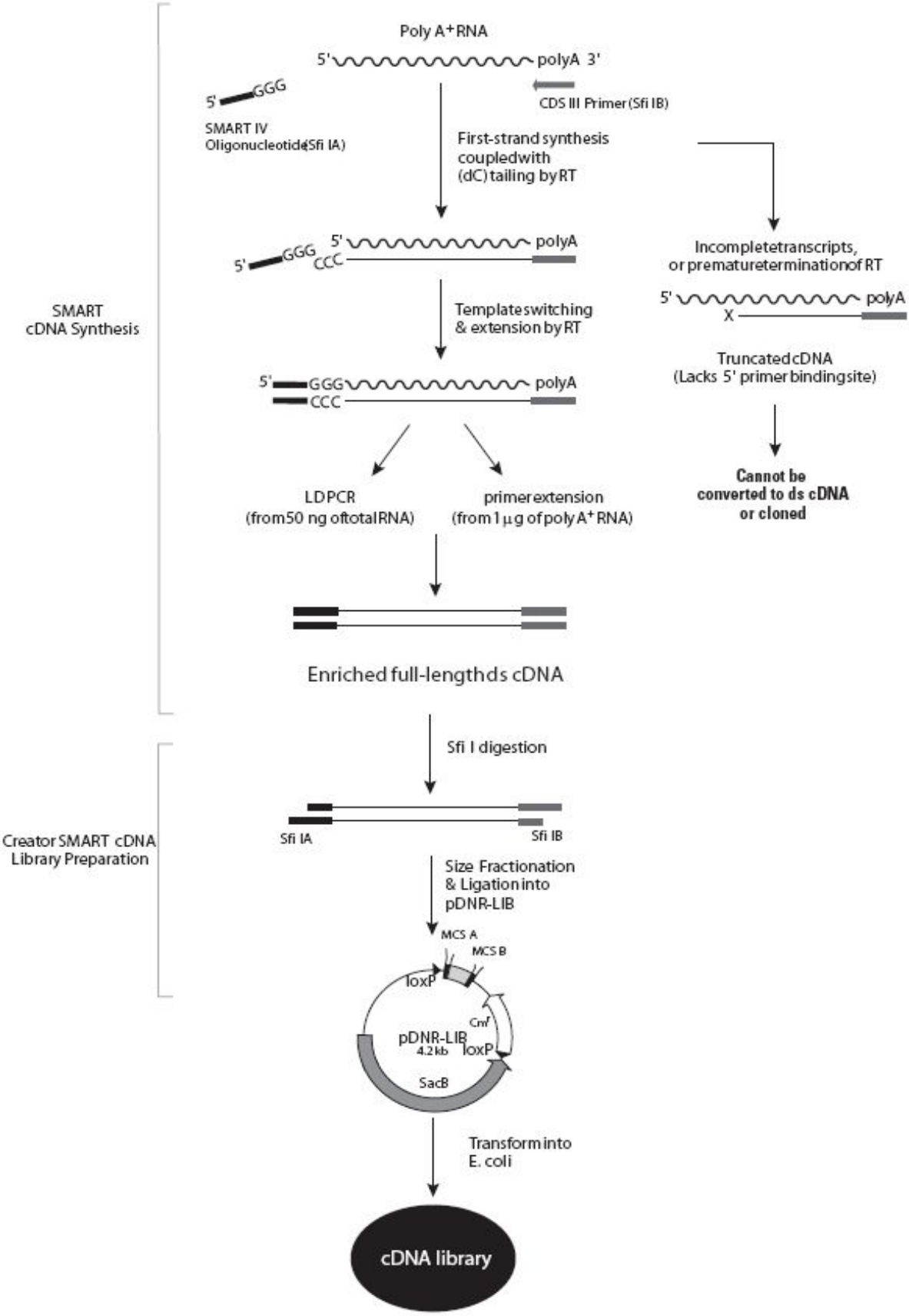


Figura 6. Representação esquemática da estratégia utilizada pelo kit Creator SMART cDNA Library Construction utilizado na construção das quatro bibliotecas de cDNA de *A. gigas*. Fonte: Protocolo do Kit Creator™ SMART™ cDNA Library Construction da Clontech (www.clontech.com).

4.5 - Síntese da fita simples de cDNA

A primeira etapa consistiu na síntese da primeira fita, na qual foram usados 3 µl de RNAm (500 ng), 1 µL de SMART IV Oligonucleotide e 1 µL de CDS III/3' PCR Primer que foram aquecidos a 72 ^{o}C por 2 minutos e imediatamente resfriados em gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 µL de 5X First-strand Buffer (250 mM Tris (pH 8.3), 30 mM $MgCl_2$, 375 mM KCl), 1 µL de DTT (20mM), 1 µL de dNTP Mix (10 mM) e 1 µL de transcriptase reversa (reverse transcriptase MMLV da Promega, 200 U/µL). Em seguida as amostras foram novamente incubadas a 42 ^{o}C por 1 hora para a síntese da fita simples.

A transcriptase reversa após sintetizar a fita complementar ao RNAm até a extremidade 5', adiciona citosinas a esta fita complementar. Isto faz com que o oligonucleotídeo SMART IV (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript), que contém guaninas na extremidade 3', se ligue à fita de cDNA servindo como novo molde para a enzima. Esta passa a sintetizar, na mesma fita de cDNA, uma seqüência complementar ao SMART IV.

4.6 - Síntese da fita dupla de cDNA

A primeira fita de cDNA possui como adaptador uma região complementar ao oligonucleotídeo SMART IV contínua com a região complementar ao RNAm. Este adaptador possui um sítio para anelamento do primer 5' da reação em cadeia de polimerase (PCR). Desta forma, a reação que produz e amplifica o cDNA fita dupla somente amplifica os fragmentos que contêm este sítio e que, portanto, possuem a seqüência completa até a extremidade 5'. As seqüências dos primers 5' e 3' e do oligonucleotídeo SMART IV estão representadas na tabela abaixo.

Tabela 2. Oligonucleotídeos do kit SMART cDNA Library Construction utilizado na construção das quatro bibliotecas de cDNA de *A. gigas*. Fonte: Protocolo do Kit SMART cDNA Library Construction (www.clontech.com).

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQÜÊNCIA
SMART IV	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG 3'
CDS III/3' PCR primer	5' ATTCTAGAGGCCGAGGCGGACATG-d$(T)_{30}$ N_{-1}N 3'
5' PCR primer	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'

Durante a síntese da fita dupla de cDNA, foram utilizados 2 µL da fita simples de cDNA, 80 µL água deionizada estéril, 10 µL de 10X Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH (pH 8.7 a 25 ^{o}C), 150 mM KOAc, 35 mM $Mg(OAc)_2$, 37.5 µg/mL BSA, 0.05% Tween 20, 0.05% Nonidet-P40), 2 µL de 50X dNTP mix, 2 µL 5'-PCR primer, 2 µL CDS III/3'-PCR primer e 2 µL de 50X Advantage 2 Polymerase mix (50% Glycerol, 15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM KCl, 0.05 mM EDTA). O programa de termociclagem consistiu de aquecimento prévio por 1 minuto a 95 ^{o}C, seguido de 26 ciclos de 15 segundos a 95 ^{o}C e 6 minutos a 68 ^{o}C.

Para confirmar a síntese da fita dupla de cDNA, 5 µL do produto de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% (m/v) com tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio (0.1 µg/mL) e visualizado em transiluminador com luz ultra-violeta.

4.7 - Tratamento com proteinase K

Para a inativação da atividade da DNA polimerase, 50 µL de cDNA fita dupla (2-3µg) foram tratados com 2 uL de proteinase K (20 µg/uL) por 20 minutos a 45 ºC e em seguida com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, conforme o protocolo do fabricante.

4.8 - Digestão com Sfi I

O passo seguinte consistiu na digestão dos fragmentos com a enzima de restrição Sfi I (20 U/µL) por 2 horas a 50 ^{o}C. Essa enzima realiza cortes assimétricos nas extremidades 3' e 5' da fita de cDNA para serem ligados ao vetor de clonagem.

4.9 - Ligação do cDNA ao vetor de clonagem

Os fragmentos de cDNA digeridos foram clonados em vetor pDNR-LIB da *Clontech Laboratories* (anexo B), seguindo as recomendações do fabricante. A reação de ligação do cDNA digerido ao vetor foi constituída de 1 µL de cDNA, 1 µL do vetor pDNR-LIB (0,1 µg/uL), 0,5 µL de tampão de ligação (500 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 0.5 mg/mL BSA), 0.5 µL de ATP (10 mM), 0.5 µL de T4 DNA ligase (400 U/µL) e 1,5 µL de água estéril. A reação foi incubada por 16 horas a 16 ^{o}C.

4.10 - Transformação em célula competente

O plasmídio recombinante foi então inserido em células competentes de *E. coli* da linhagem *MosBlue* (previamente tratadas com $CaCl_2$) por meio de transformação por choque térmico.

Desta forma, 200 µL de células competentes recém retiradas do freezer -80 ^{o}C foram colocadas em gelo para descongelar e 5 uL da reação de ligação foram adicionados aos 200 µL de células competentes. Em seguida, as células foram mantidas em gelo por 30 min e depois transferidas para banho-maria a 42 ^{o}C por exatamente 40 segundos e então resfriadas imediatamente em gelo por 2 minutos. Após esse período, foram adicionados 800 µL de meio LB (Luria-Bertani) sem antibiótico e as células foram incubadas a 37 ^{o}C por 1h e depois semeadas em meio LB sólido contendo Cloranfenicol (30 mg/mL) e Tetraciclina (15 mg/mL) e incubadas em estufa BOD a 37 ^{o}C por 16 horas.

4.11 - Seleção e estoque dos clones

Os clones transformantes foram facilmente identificados em função do vetor pDNR-LIB possuir um gene suicida que é ativado caso não haja inserto no DNA circular do vetor. As colônias foram selecionadas utilizando palitos estéreis e cultivadas em microplacas *deepwell* de 96 poços, contendo em cada poço 1 mL de meio LB acrescido de Cloranfenicol (30 µg/mL) e Tetraciclina (15 µg/mL). As colônias cresceram em incubadora por 22 horas, a 37 ^{o}C, com agitação de 180g. Em seguida, placas de estoque foram preparadas utilizando 100 µL da cultura e 15 µL de glicerol 70% autoclavado e mantidas por 24 horas em freezer -20 ^{o}C e transferidas para freezer -80 ^{o}C.

4.12 - Mini-preparação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial dos clones selecionados foi isolado por procedimento de “mini-prep” (Sambrook *et al*., 1989) com a introdução do filtro (PVDF – 0.2 µm – Millipore) para purificação do material.

Os clones foram cultivados em 1 mL de meio LB acrescido com Cloranfenicol (30 µg/mL) e Tetraciclina (15 µg/mL) e mantidos a 37 ºC, a 180g por 22 horas. Após o cultivo, as placas contendo os clones foram centrifugadas a 3000g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e a placa invertida por 5 minutos em papel absorvente para total eliminação do meio de cultura.

Em seguida, 240 µL da solução I (Glicose 50mM; Tris 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0) foram adicionados a cada poço e a placa foi agitada em "vortex" até a completa ressuspensão das células. A seguir, a placa foi centrifugada a temperatura ambiente por 6 minutos a 3000g e o sobrenadante descartado por inversão. Foram adicionados 80 µL de solução I/RNAse (80 µL de solução I acrescida de 5 µL de RNase A, 10 mg/mL). As células foram totalmente ressuspensas por agitação em "vortex" e todo o volume foi transferido para uma microplaca de fundo “U” e adicionados 60 µL de solução II (NaOH 0,2N; SDS 1% (m/v)). Após agitação por inversão, as placas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo previsto, 60 µL da solução III (6 mL de

acetato de potássio 5 M, 1,15 mL de ácido acético glacial e 92,85 mL de água estéril) gelada foram adicionados a cada poço e as placas foram agitadas por inversão. Em seguida, a placa foi centrifugada a temperatura ambiente por 6 minutos a 3000g e incubada a 90 ^{o}C por 30 minutos. Após incubação, a placa foi resfriada imediatamente em gelo por 10 minutos e centrifugada a temperatura ambiente por 6 min a 3000g.

Todo o volume dos poços da microplaca foi filtrado em filtro PVDF - 0,2 µm, por meio de centrifugação a temperatura ambiente por 6 minutos a 3000g. Ao filtrado foi acrescentado 110 µL de isopropanol absoluto e misturado suavemente por inversão. Em seguida, a placa foi centrifugada à temperatura ambiente por 45 minutos a 3000g e o sobrenadante descartado por inversão. A cada poço da placa foram adicionados 200 µL de etanol 70% gelado (v/v) e a placa foi centrifugada a temperatura ambiente por 6 min a 3000g. As placas foram mantidas a temperatura ambiente até secagem dos “pellets” e, posteriormente, o DNA foi ressuspendido em 20 µL de água milli-Q autoclavada.

A placa foi selada, mantida por 16 horas a 4 ^{o}C e transferida para um freezer a -20 ^{o}C. A integridade do DNA plasmidial foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio (0.1 µg/mL) e visualizado em transiluminador com luz ultra-violeta (UV).

4.13 - Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento consistiu na adição de 1 µL de *Big Dye* v 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), 1,5 µL de tampão *Big Dye* 2X (200 mM Tris-HCl, pH 9,0; 5 mM $MgCl_2$), aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial, 3,2 *p*mol de oligonucleotídeo M13 reverso (CAGGAAACAGCTATGAC) e completada com água estéril até um volume final de 10 µL em placa de 96 poços. O programa de termociclagem consistiu das seguintes temperaturas: 96 ^{o}C por 2 minutos e 39 ciclos de 96 ^{o}C por 30 segundos, 50 ^{o}C por 20 segundos e 60 ^{o}C por 4 minutos.

Após a PCR, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento adicionando 40 µL de isopropanol 65% (v/v) em cada poço. As amostras

permaneceram à temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz e foram centrifugadas por 30 minutos a 3000g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 60% (v/v) foram adicionados. A placa foi novamente centrifugada à temperatura ambiente por 5 minutos a 3000g. O sobrenadante foi descartado por inversão e as amostras secas por 1 hora a 37 ^{o}C ao abrigo da luz. Em seguida foram acrescentados 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) em cada poço e a placa foi aquecida a 95 ^{o}C por 5 minutos, resfriada em gelo por mais 2 minutos e injetada no seqüenciador automático de 4 capilares - ABI 3130 *Sequence Analyzer* (Applied Biosystems).

4.14 - Análise das ESTs Obtidas

As seqüências geradas pelo seqüenciador foram analisadas por uma série de softwares de acordo com o diagrama apresentado na figura 7, abaixo:

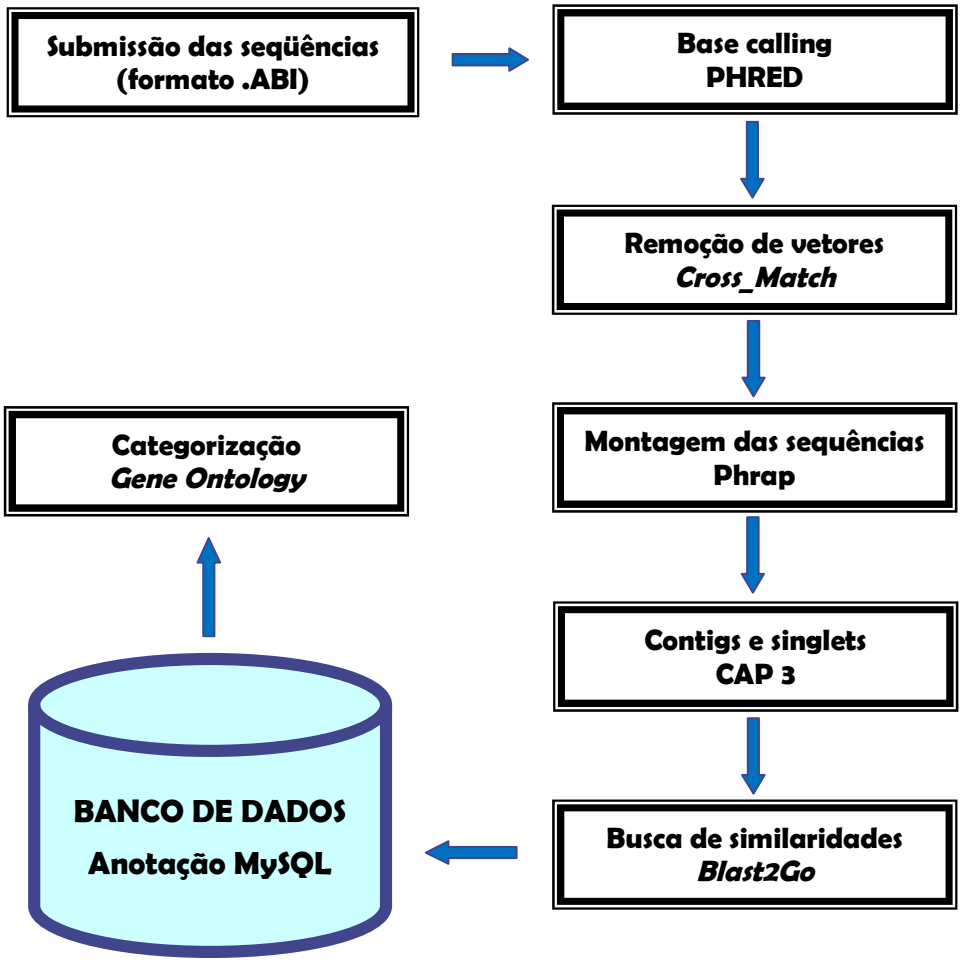


Figura 7. Pipeline utilizado para anotação dos genes encontrados em *Arapaima gigas*.

4.14.1 - Análise de qualidade das seqüências (*Phred*)

Este programa reconhece a seqüência de nucleotídeos a partir do arquivo de dados brutos do seqüenciador, atribui valores de qualidade às bases constituintes da seqüência nucleotídica e gera arquivos de saída. Para as seqüências geradas no estudo, foram consideradas apenas as seqüências com mais de 100 bases com qualidade superior a 20 (Phred >20, ou seja, no máximo um erro a cada 100 bases seqüenciadas); as que não atingiram esse parâmetro foram removidas da análise.

Juntamente com a análise de qualidade das bases foi utilizado o programa *Cross_match* para a substituição das regiões correspondentes às seqüências de vetor, adaptadores das extremidades dos insertos e caudas poli(A). Este programa faz a comparação da seqüência desejada com um banco de seqüências de vetores e, onde o programa encontra similaridade entre as seqüências, a mascara acrescentando letras X à seqüência desejada. Desta maneira, os nucleotídeos das seqüências de entrada similares a regiões de vetores de clonagem serão alterados para X e não atrapalharão os processos posteriores de análise computacional (Prosdocimi *et al*., 2002).

4.14.2 - Clusterização (*Cap3*)

As seqüências selecionadas a partir dos parâmetros de qualidade estabelecidos foram submetidas à clusterização pelo programa *Cap3.* Este programa permitiu a montagem dos *contigs*, onde as seqüências referentes a uma mesma seqüência consenso foram alinhadas por regiões com alta qualidade de bases.

4.14.3 - Identidade das ESTs

As ESTs obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco público de seqüências do NCBI por meio do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) e com as seqüências do banco de dados do Centro Universitário Nilton Lins.

As comparações foram realizadas utilizando-se o programa BLAST2GO, contra o banco não redundante (BlastX) e contra os bancos de EST's (BlastN) de peixes do NCBI *Danio rerio*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*, *Crocodylus niloticus* e *Xenopus laevis*.

4.14.4 - Classificação das EST's de acordo com as categorias do *Gene Ontology*

Após as análises de bioinformática, os genes encontrados foram categorizados de acordo com o *Gene Ontology* (GO) *Consortium*. O GO (www.geneontology.org) foi desenvolvido como uma nomenclatura sistemática e padronizada para a anotação de genes em vários organismos. O GO é dividido em três categorias que refletem aspectos conservados da biologia: função molecular, processos biológicos e componentes celulares. Os vocabulários contêm uma estrutura hierárquica de termos designados para descrever o que o produto de um dado gene faz e onde está localizado na célula. Deste modo, os genes podem ser anotados em mais de um termo de cada ontologia, uma vez que um gene pode ter mais de uma função, estar envolvido em uma variedade de processos biológicos, bem como desempenhar funções em vários locais na célula (Hill *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2002).

As 3 categorias que compreendem a classificação do *Gene Ontology* e suas subcategorias são:

- Componente celular
  - ✓ Celular
  - ✓ Complexo imunoglobulina
  - ✓ Componente celular desconhecido
  - ✓ Extra-celular
  - ✓ Não localizado
  - ✓ Obsoleto
  - ✓ Vírion

- Processo Biológico
  - ✓ Comportamento
  - ✓ Desenvolvimento
  - ✓ Obsoleto
  - ✓ Processo biológico desconhecido
  - ✓ Processo celular
  - ✓ Processo fisiológico

- Função Molecular
  - ✓ Atividade adesão celular
  - ✓ Atividade catalítica
  - ✓ Atividade chaperona
  - ✓ Atividade estabilização protéica
  - ✓ Atividade estrutural
  - ✓ Atividade imune
  - ✓ Atividade motora
  - ✓ Atividade transportadora
  - ✓ Função molecular desconhecida
  - ✓ Ligante
  - ✓ Obsoleto
  - ✓ Proteína alvo
  - ✓ Regulador da apoptose
  - ✓ Regulador da transcrição
  - ✓ Regulador enzimático
  - ✓ Transdutor de sinal

4.14.5 - Padrão de expressão digital

O padrão de expressão digital das ESTs foi obtido de acordo com a freqüência relativa destas nas quatro bibliotecas, sendo considerados diferencialmente expressos, os genes cujas ESTs estavam presentes em pelo menos uma biblioteca e ausente nas demais ou com freqüências diferentes nas quatro bibliotecas.

5 – RESULTADOS

Os resultados a seguir referem-se à identificação de genes diferencialmente expressos em machos e fêmeas de *A. gigas* na fase reprodutiva (adultos) e não reprodutiva (jovens).

Foram construídas quatro bibliotecas de EST's de *A. gigas*, nas seguintes condições: pirarucus Machos Adultos (MA), pirarucus Machos Jovens (MJ), pirarucus Fêmeas Adultas (FA) e pirarucus Fêmeas Jovens (FJ).

5.1 - Extração do RNAm

Após a extração do RNAm, foi avaliada a integridade do material extraído e possível contaminação por DNA genômico, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com tampão TAE 1X e corado com brometo de etídio (0.1 µg/ml), conforme mostrado na figura 8.

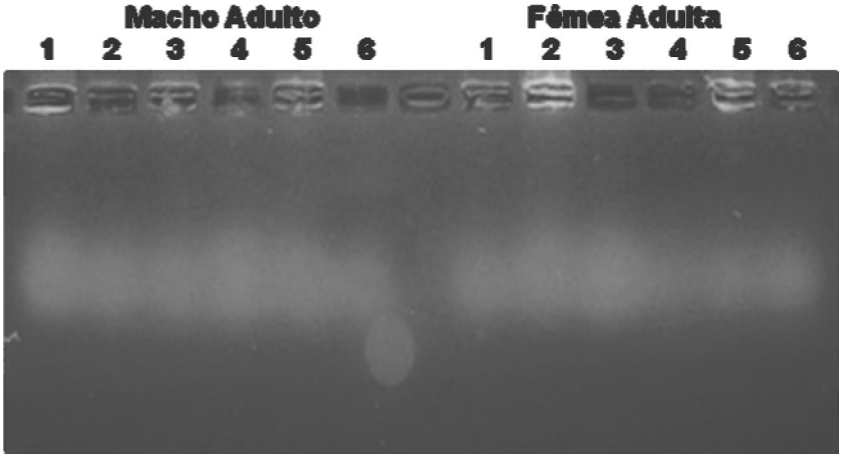


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), mostrando a integridade do RNAm extraído das hipófises de adultos de *Arapaima gigas.* O mesmo procedimento foi realizado para as amostras dos jovens.

As amostras que apresentaram contaminação por DNA genômico foram tratadas com DNAse 1 U/µL. Em seguida foram quantificadas em NanoDrop® (Thermo Scientific) e utilizadas na composição do *pool* de RNAm.

5.2 - Construção das bibliotecas de cDNA

O kit SMART cDNA Library Construction (Clontech/UK) foi utilizado para a construção das bibliotecas de cDNA a partir de 500 ng do *pool* de RNAm, de cada uma das quatro condições (MA, MJ, FA e FJ), seguindo as recomendações do fabricante.

O cDNA dupla-fita, sintetizado a partir do RNAm, mostrou fragmentos maiores para o *pool* de jovens do que para os adultos, conforme as figuras 9 e 10, abaixo.

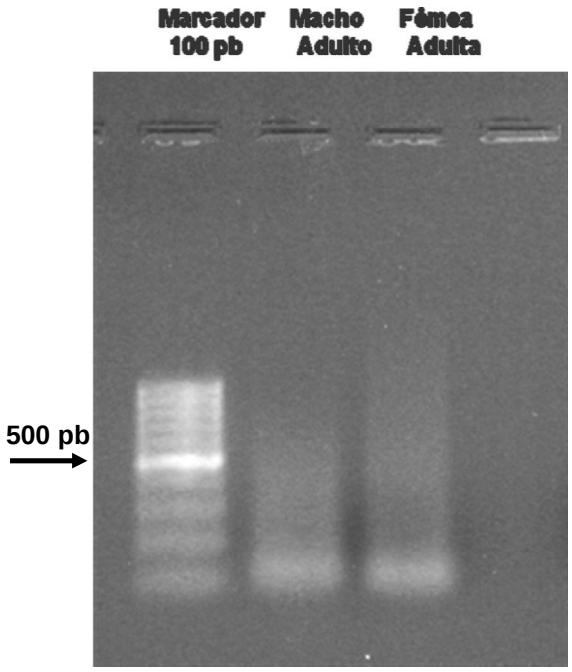


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do cDNA utilizado para a construção das bibliotecas de machos e fêmeas adultas de *Arapaima gigas*.

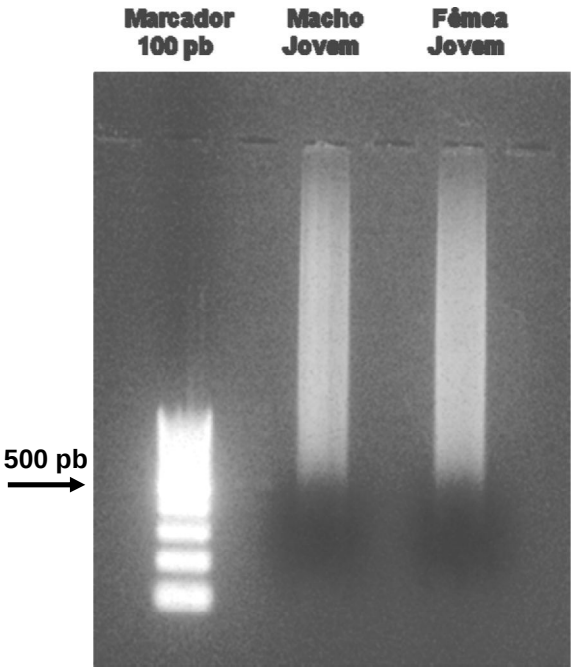


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) do cDNA utilizado para a construção das bibliotecas de machos e fêmeas jovens de *Arapaima gigas*.

Em seguida, as amostras de cDNA foram tratadas com proteinase K (20 µg/uL), digeridas com enzima de restrição Sfi I (20 U/µl) e inseridas em células bacterianas de *E. coli* da linhagem *MosBlue*, conforme descrito no item 4.10.

Para confirmar a presença de insertos no interior das bactérias, alguns clones foram escolhidos aleatoriamente e digeridos com a enzima de restrição Bam HI (10 U/µl), conforme mapa do vetor pDNR-LIB (anexo 2). O produto dessa reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), conforme figura 11.

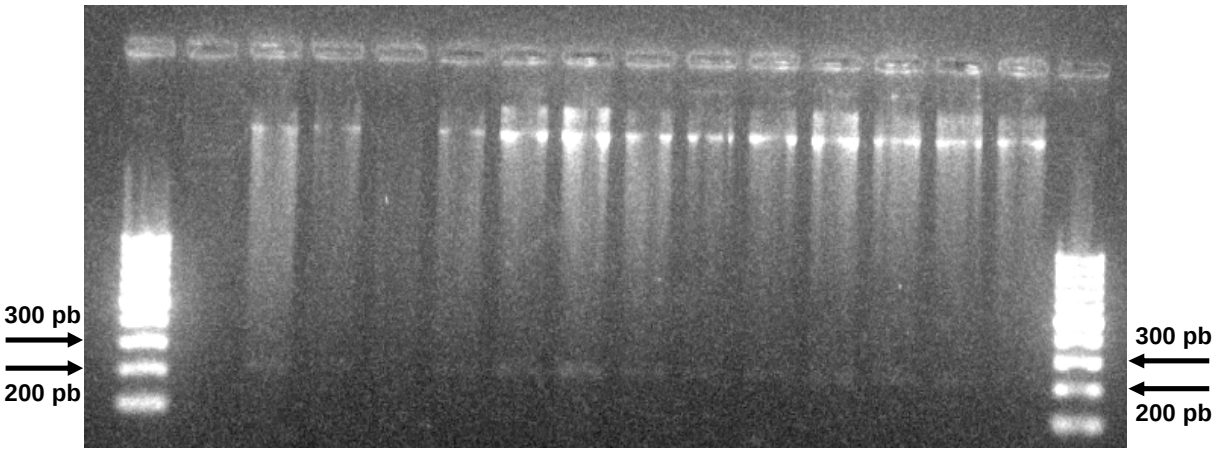


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) da digestão dos clones das bibliotecas de *Arapaima gigas*, confirmando o tamanho dos insertos entre 200 e 300 pb na maioria dos poços.

Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial contendo os fragmentos de interesse, sendo o produto dessa reação seqüenciado conforme itens 4.12 e 4.13.

5.3 - Análise das seqüências geradas

No total, as quatro bibliotecas compreenderam 3857 clones (tabela 3). A biblioteca de Macho Jovem apresentou o maior número de clones com 1096 e a biblioteca de Macho Adulto o menor, com 781 clones.

De acordo com o índice de novidade médio (tabela 3), constatamos que as bibliotecas dos jovens obtiveram melhores resultados, sendo 86% para a biblioteca de Macho Jovem e 74% para a biblioteca de Fêmea Jovem.

Tabela 3. Número de seqüências geradas e índice de novidade médio das quatro bibliotecas de *Arapaima gigas.*

	Macho Adulto (MA)	Macho Jovem (MJ)	Fêmea Adulta (FA)	Fêmea Jovem (FJ)
Seqüências geradas	781	1096	956	1024
I.N.M. (índice de novidade médio)	48%	86%	54%	74%

Após o seqüenciamento, as seqüências geradas foram analisadas por uma série de softwares, de acordo com o *pipeline* mostrado na figura 7, com o objetivo de atribuir valores de qualidade, mascarar vetores, alinhar as seqüências consenso, identificar os genes encontrados, subtrair aqueles diferencialmente expressos e analisar as suas vias metabólicas.

As seqüências geradas produziram os seguintes resultados:

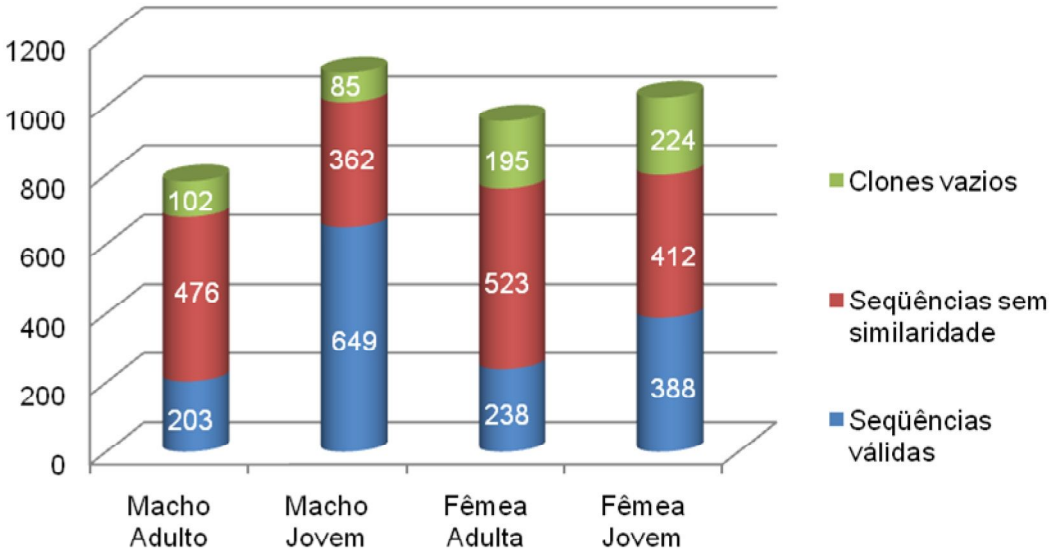


Figura 12: Tipos de seqüências observadas nas quatro bibliotecas de *Arapaima gigas.*

5.4 - Avaliação dos insertos clonados

Os fragmentos encontrados nas bibliotecas possuíam tamanho variável (figura 13). As bibliotecas dos indivíduos jovens (machos e fêmeas) apresentaram elevada porcentagem de fragmentos acima de 150 pb (67% e 63%, respectivamente). Porém, as bibliotecas de adultos (machos e fêmeas) foram constituídas, em sua maioria, por insertos de tamanho pequeno com até 149 pb (83% e 79%, respectivamente).

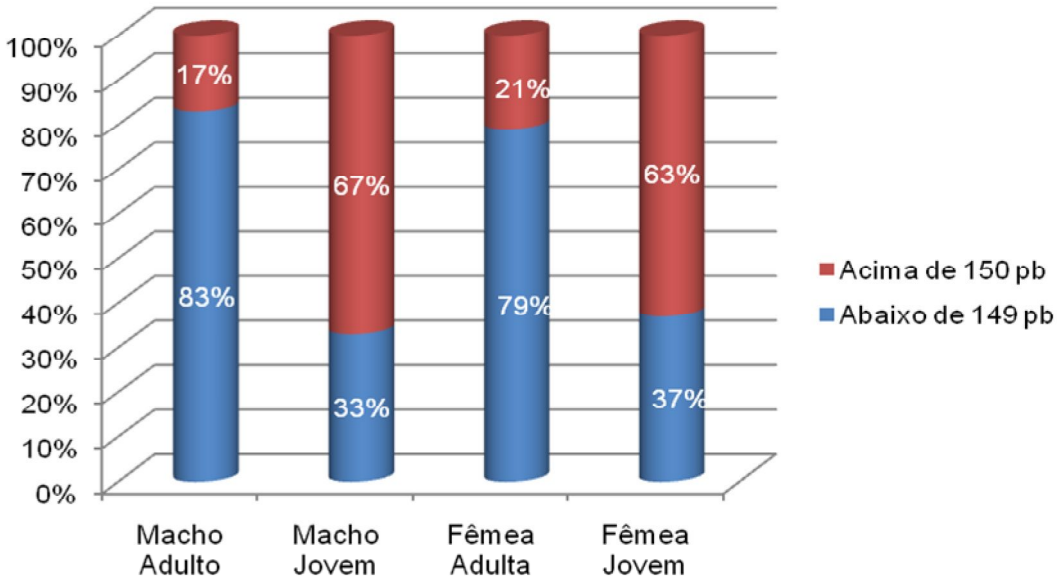


Figura 13. Tamanho dos insertos encontrados nas quatro bibliotecas de *Arapaima gigas.*

5.5 - Perfil de expressão gênica

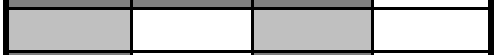
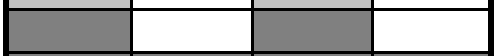
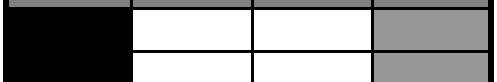
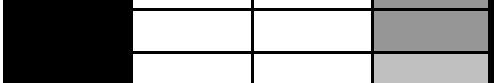
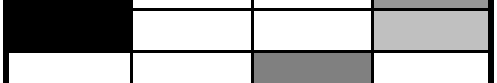
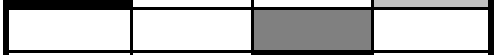
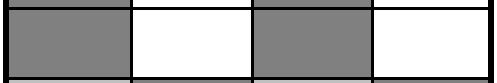
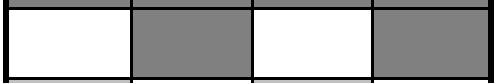
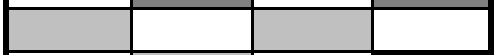
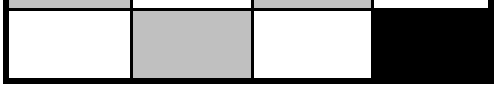
A figura 14 mostra a freqüência dos genes diferencialmente expressos em cada uma das quatro bibliotecas de cDNA de *A. gigas*. A diferença de cor representa a freqüência do gene na respectiva biblioteca, variando de preto (muito freqüente) até branco (ausente).

Podemos notar a presença de vários genes relacionados à atividade hormonal, como receptor do hormônio de crescimento, receptor do hormônio luteinizante, receptor de estrógeno e receptor da prolactina. Esses genes foram classificados como diferencialmente expressos, pois estavam presentes em proporções diferentes nas quatro bibliotecas analisadas (MA, MJ, FA, FJ).

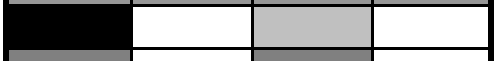
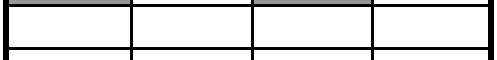
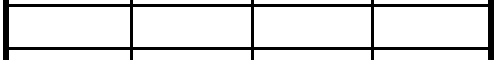
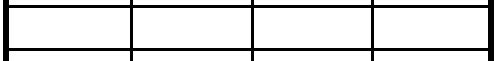
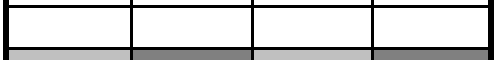
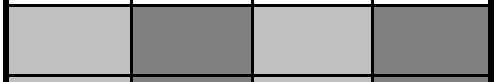
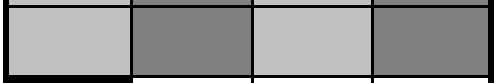
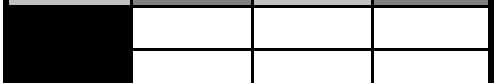
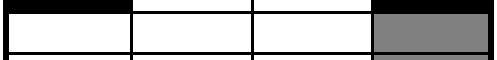
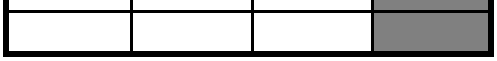
Figura 14. Freqüência dos genes classificados como diferencialmente expressos nas quatro bibliotecas de cDNA de *Arapaima gigas*. A variação de cor indica a freqüência do gene em cada biblioteca. Preto: muito freqüente; Cinza escuro: freqüência mediana; Cinza claro: pouco freqüente e Branco: não observado na biblioteca.

	Macho Adulto	Macho Jovem	Fêmea Adulta	Fêmea Jovem
Alpha 3 type I collagen				
(B101) MHC class I alpha 2				
Actinin-associated LIM protein				
Activin receptor IIB				
Alpha-1A adrenoreceptor				
Alpha-1-microglobulin/bikunin				
Alpha2,3-sialyltransferase				
Alpha2,3-sialyltransferase				
Alpha-2,8-polysialyltransferase IV				
Amine oxidase [flavin-containing]				
Aryl hydrocarbon receptor				
Aryl hydrocarbon receptor 1 alpha				
Aryl hydrocarbon receptor 2 alpha				
Aryl hydrocarbon receptor 2 delta				
Aryl hydrocarbon receptor 2 gamma				
Beclin 1				
Beta-3b-adrenergic receptor				
BRD2				
Carbamoyl-phosphate synthetase III				
Caudal-type homeobox protein 1				
CD4				
CD8 beta				
CGMP-gated channel				
Clock protein				
Clusterin-2 protein				
Collagen a1(I)				
Collagen a3(I)				
Collagen alpha-2(I) chain precursor				
Collagen alpha-2(I) chain precursor				
Complement C3-1				
Complement C4				
Complement component C3-3				
Complement component C3-4				
Complement component C6				
Complement receptor-like protein 1 precursor				

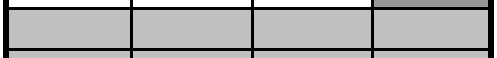
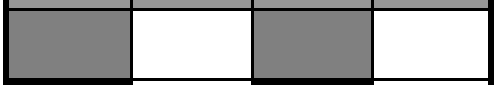
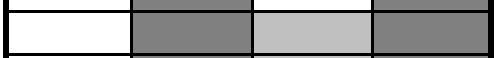
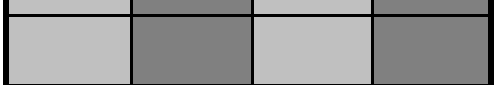
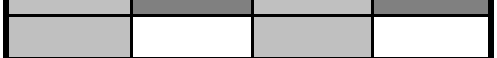
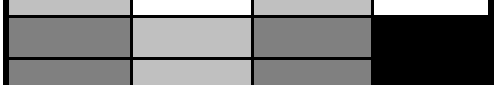
Continua...

Corticotropin releasing factor	
Corticotropin releasing factor binding protein	
Corticotropin-lipotropin B precursor	
Corticotropin-releasing factor receptor type 1	
CXC chemokine receptor	
Cyclooxygenase 2	
Cyclooxygenase-1	
Cysteine proteinase	
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator II	
Cytochrome b	
Cytochrome c oxidase subunit Vb	
Cytokine receptor precursor	
Delta-6 fatty acyl desaturase	
Dopamine D2 receptor 1	
Epithelial calcium channel	
Estrogen receptor	
Estrogen receptor alpha	
Estrogen receptor alpha 2	
Follistatin	
Glial fibrillary acidic protein	
Glucokinase	
Glucose transporter 1A	
Glutamate dehydrogenase	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
Gonadoliberin	
Granulocyte colony stimulating factor receptor	
Growth hormone receptor isoform 1	
Growth hormone receptor isoform 1 precursor	
Heat shock factor 2	
Heat shock transcription factor 1 isoform b	
Hemoglobin subunit beta-4	
Histone H1	
Histone H1-0	
Homocysteine-responsive ER-resident ubiquitin-like domain member 1	
Inducible nitric oxide synthase	
Latent transforming growth factor binding protein	

Continua...

Leukocyte elastase inhibitor	
Liver-expressed antimicrobial peptide 2A	
Luteinizing hormone receptor LHR	
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	
Prolactin receptor	
Prolactin-releasing peptide C-RFamide	
Prolactin-releasing peptide receptor	
Pro-MCH 1 precursor	
Prostaglandin G/H synthase 2b	
Protamine PTP4	
Protamine TP17	
Protamine-1A	
Protamine-1B	
Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform A	
Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform B	
Pumilio-2A	
Pumilio-2B	
Putative BRD2	
Putative membrane progestin receptor beta	
RGL2	
RH1 opsin	
RhAG-like protein	
Rhamnose binding lectin STL1	
Rod opsin	
Rod-like opsin	
RTN8	
Serine/threonine protein kinase RAF1c	
Signal transducer and activator of transcription 5	
Similar to Tetraodon protein product CAG00085	
Simple type II keratin K8a	
Simple type II keratin K8b	
Sodium-calcium exchanger III	
Somatic lipoprotein receptor	
Somatostatin receptor type 1 subtype A	
Somatostatin receptor type 1 subtype B	
Sox8	
SOX9	
SOX9 alpha2	

Continua...

SoxP1	
Stat3	
Sub-family B ATP-binding cassette transporter 2	
TAP1	
TAP1 protein	
Tapasin-related	
Tapasin-related variant	
Testicular cytochrome P45011beta	
Toll-like receptor 3	
Toll-like receptor 3-like protein	
Transport-associated protein	
Tumor necrosis factor receptor associated factor 2	
Tumour necrosis factor receptor	
Type II iodothyronine deiodinase	
Type II keratin E2	
Type II keratin E3	
Tyrosinase-related protein 1	
Tyrosine-protein kinase receptor	
VHSV-induced protein	
VHSV-induced protein-9	
Vimentin	
Vitamin D receptor	
Voltage-gated calcium channel subunit Cav1.3	
Voltage-gated calcium channel subunit Cav2.2 variant I	
Voltage-gated calcium channel subunit Cav2.2 variant II	
Vomeronasal receptor-like protein	
Wilms' tumor suppressor 1b variant	
Zic family member 1	
Zinc/iron-regulated protein	
Zonadhesin-like	

5.6 - Categorização dos genes

Para conhecer a ontologia dos genes identificados, foi utilizado o algorítimo Gene Ontology para a categorização da biblioteca de Macho Adulto (tabela 4 e figura 15), Macho Jovem (tabela 5 e figura 16), Fêmea Adulta (tabela 6 e figura 17) e Fêmea Jovem (tabela 7 e figura 18).

Analisando a categorização da biblioteca de Macho Adulto, notamos que a maioria dos genes encontrados está relacionada com Função Molecular (13,28%), seguido de Componente Celular (12,18%) e Processo Biológico (11,86%).

Na biblioteca de Macho Jovem, houve maior representatividade da categoria Processo Biológico com 13,76% dos genes, seguido de Função Molecular (13,06%) e Componente Celular (9,53%). Diferentemente da biblioteca de Macho Adulto, foram encontrados genes que fazem parte das categorias Transcrição (4,79%) e Regulador da Transcrição (1,68%).

No entanto, na biblioteca de Fêmea Adulta as categorias mais representadas foram Função Molecular (14,44%), Componente Celular (10,84%) e Processo Biológico (10,74%). Contudo, assim como na biblioteca de Macho Adulto, a categoria citoesqueleto teve representatividade de 1,93% para Fêmea Adulta e de 1,32% para Macho Adulto.

Na biblioteca de Fêmea Jovem, as principais categorias foram Função Molecular (13,98%), Processo Biológico (12,38%) e Metabolismo (7,75%). Diferentemente da biblioteca de Macho Jovem, onde a categoria Componente Celular correspondeu a 9,53% dos genes, foram encontrados apenas 6,12% dos genes relacionados a essa categoria na biblioteca de Fêmea Jovem. Assim como ocorreu na biblioteca de Macho Jovem, as categorias Transcrição (6,26%) e Regulador da Transcrição (1,39%) tiveram elevada representatividade.

Tabela 4. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Macho Adulto de *Arapaima gigas.*

ATIVIDADE	REPRESENTATIVIDADE
Função Molecular	13.28%
Componente Celular	12.18%
Processo Biológico	11.86%
Célula	11.36%
Ligação	5.21%
Intracelular	3.57%
Atividade catalítica	3.24%
Transdução de sinal	2.85%
Comunicação celular	2.85%
Atividade transdutora de sinal	2.80%
Receptor	2.41%
Metabolismo	2.25%
Diferenciação celular	2.09%
Ligação de ácidos nucléicos	1.81%
Ligação ao DNA	1.70%
Ligação de nucleotídeos	1.70%
Núcleo	1.37%
Citoesqueleto	1.32%
Transporte	1.21%
Desenvolvimento	1.10%
Funções pouco representadas (< 1%)	13.84%
TOTAL	**100%**

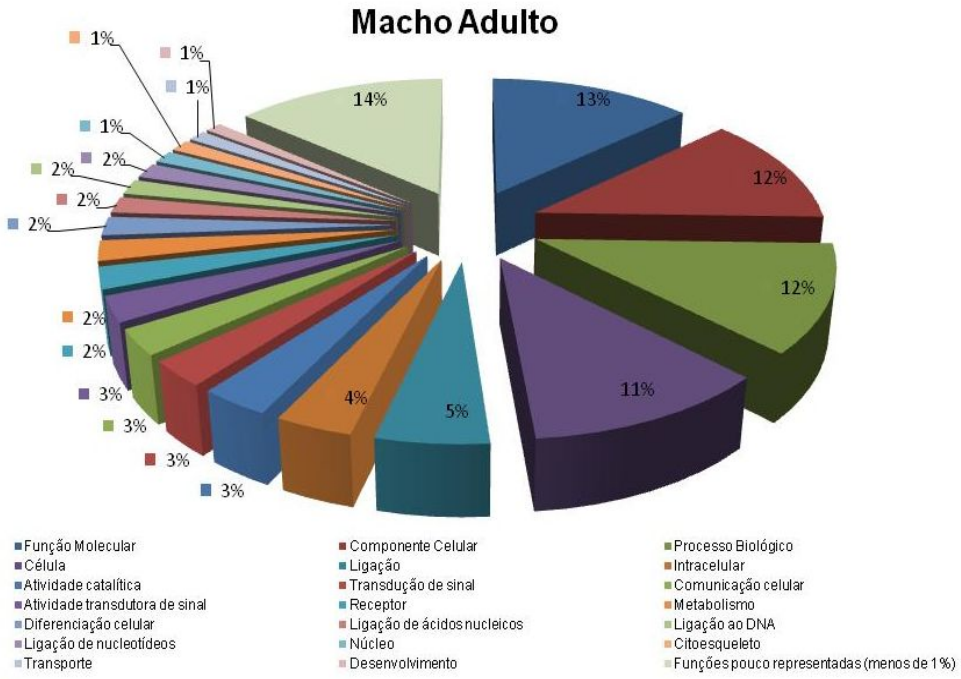


Figura 15. Categorização da biblioteca de Macho Adulto de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology).

Tabela 5. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Macho Jovem de *Arapaima gigas.*

ATIVIDADE	REPRESENTATIVIDADE
Processo biológico	13.76%
Função molecular	13.06%
Componente celular	9.53%
Célula	9.15%
Ligação	6.85%
Metabolismo	4.97%
Metabolismo de ácidos nucléicos	4.79%
Transcrição	4.79%
Ligação de nucleotídeos	3.44%
Intracelular	3.24%
Núcleo	3.24%
Ligação de ácidos nucléicos	2.35%
Ligação ao DNA	2.32%
Atividade transdutora de sinal	2.26%
Atividade catalítica	2.15%
Hidrolase	1.91%
Receptor	1.74%
Regulador da transcrição	1.68%
Transdução de sinal	1.50%
Comunicação celular	1.50%
Transporte	1.38%
Atividade transportadora	1.26%
Funções pouco representadas (< 1%)	3.13%
TOTAL	**100%**

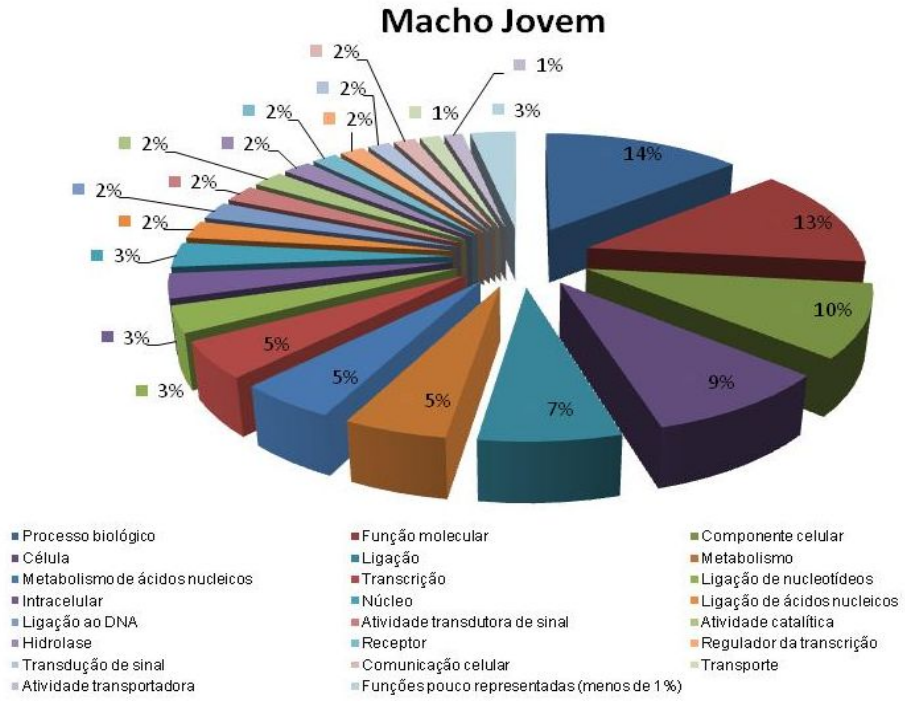


Figura 16. Categorização da biblioteca de Macho Jovem de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology).

Tabela 6. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Fêmea Adulta de *Arapaima gigas.*

ATIVIDADE	REPRESENTATIVIDADE
Função Molecular	14.44%
Componente Celular	10.84%
Processo Biológico	10.74%
Célula	9.98%
Ligação	6.43%
Intracelular	3.65%
Atividade transdutora de sinal	3.39%
Receptor	2.89%
Transdução de Sinal	2.53%
Comunicação celular	2.53%
Metabolismo	2.48%
Atividade catalítica	2.13%
Transporte	2.08%
Ligação de nucleotídeos	2.03%
Citoesqueleto	1.93%
Metabolismo de ácidos nucléicos	1.87%
Transcrição	1.87%
Atividade transportadora	1.77%
Ligação de ácidos nucléicos	1.52%
Ligação ao DNA	1.42%
Ligação a proteínas	1.27%
Núcleo	1.06%
Hidrolases	1.01%
Canais iônicos	1.01%
Funções pouco representadas (< 1%)	9.13%
TOTAL	**100%**

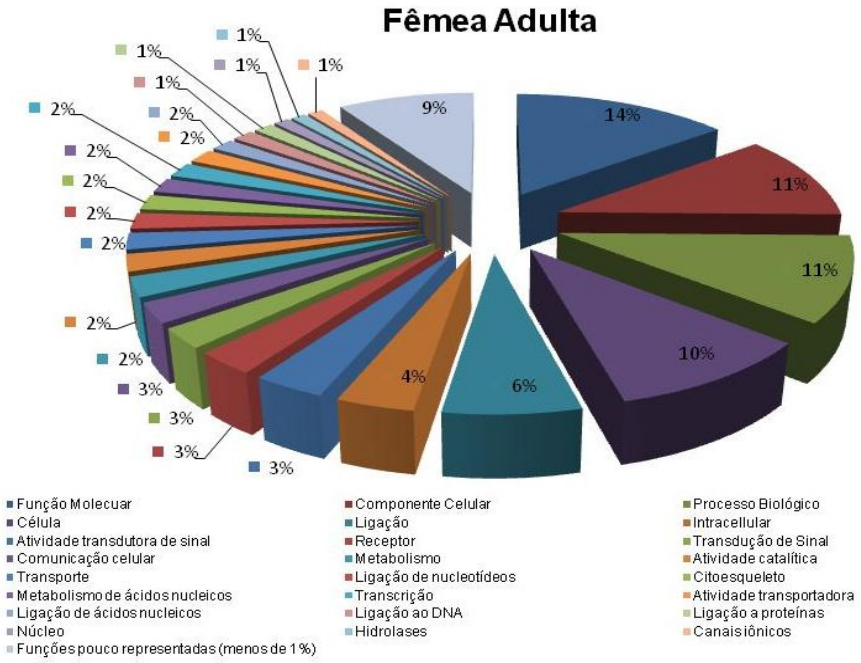


Figura 17. Categorização da biblioteca de Fêmea Adulta de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology).

Tabela 7. Análise feita pelo Gene Ontology da biblioteca de Fêmea Jovem de *Arapaima gigas.*

ATIVIDADE	REPRESENTATIVIDADE
Função molecular	13.98%
Processo biológico	12.38%
Metabolismo	7.75%
Ligação	6.74%
Metabolismo de ácidos nucléicos	6.26%
Transcrição	6.26%
Componente celular	6.12%
Célula	5.88%
Atividade transdutora de sinal	3.50%
Ligação ao DNA	3.26%
Ligação de ácidos nucléicos	3.26%
Atividade catalítica	2.83%
Intracelular	2.78%
Núcleo	2.78%
Receptor	2.67%
Transdução de sinal	2.30%
Comunicação celular	2.30%
Regulador da transcrição	1.39%
Funções pouco representadas (< 1%)	7.66%
TOTAL	**100%**

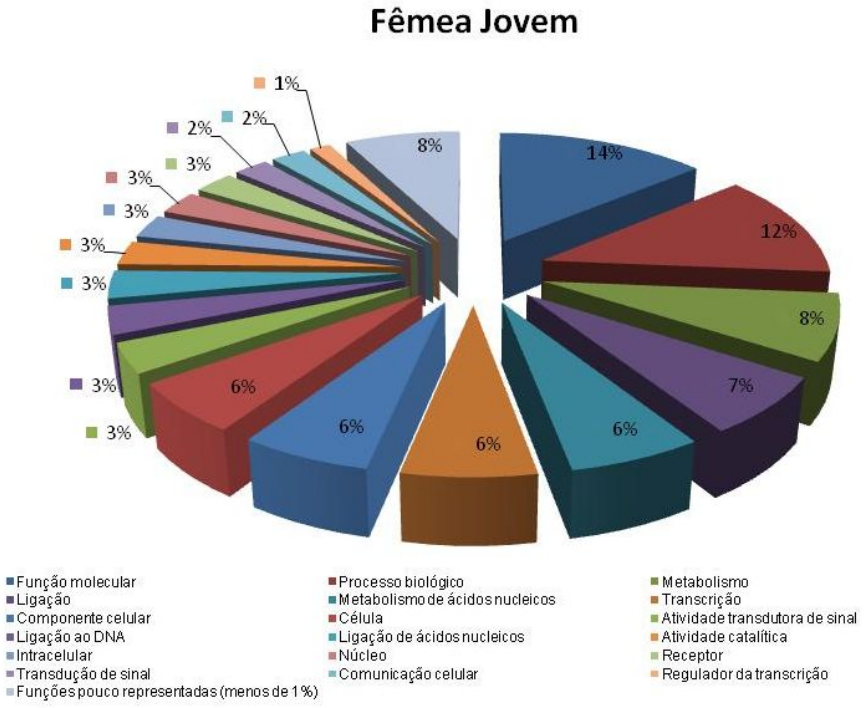


Figura 18. Categorização da biblioteca de Fêmea Jovem de *Arapaima gigas*, utilizando o software BLAST2GO para a determinação da ontologia dos genes encontrados (Gene Ontology).

A partir dos genes encontrados, foram selecionados oito genes expressos diferencialmente nas quatro bibliotecas de cDNA de *A. gigas* (MA, MJ, FA e FJ), conforme tabela 8.

A escolha desses genes foi baseada na sua relação com a reprodução e o crescimento de *A. gigas*, especialmente genes que atuam como ativadores e inibidores da secreção de hormônios. Os genes selecionados estão indicados na tabela 8.

Tabela 8. Genes expressos diferencialmente nas bibliotecas de cDNA e relacionados à reprodução e ao crescimento de *Arapaima gigas.*

	GENE	Blast X	GO
1	Estrogen receptor	Q0H7E4	GO: 0005216
2	Luteinizing hormone receptor LHR	Q71MM9	GO: 0001585
3	Prolactin receptor	Q9DE08	GO: 0004872
4	Growth hormone receptor isoform 1	Q5I2A8	GO: 0004872
5	Somatostatin receptor type 1 subtype A and B	Q5G547	GO: 0003677
6	Follistatin	Q3LRW7	GO: 0004930
7	Activin receptor IIB	A0N0F4	GO: 0004672
8	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	Q98SP4	GO: 0005179

Para conhecer os processos biológicos desses genes, foi utilizada a ferramenta Gene Ontology para gerar as árvores de GO, detalhando as principais vias de ação dos oito genes selecionados (anexos C ao J). Por meio dessas árvores, podemos compreender o mecanismo de ação de cada gene, bem como a sua importância como receptores para os processos fisiológicos dos organismos desde o nível mais específico até o mais abrangente.

Na tabela 9 (abaixo) são mostradas as informações fornecidas pelo Blast X dos oito genes selecionados, assim como o número de bases de cada gene, o percentual de similaridade e a seqüência de aminoácidos.

Tabela 9. Blast X dos oito genes relacionados ao crescimento e à reprodução de *Arapaima gigas.*

	GENE	Blast X
1	**Estrogen receptor**	**>Q0H7E4_ONCMY** Length = 558 Score = 24.6 bits (52), Expect = 1.6 Identities = 10/17 (58%), Positives = 12/17 (70%) Frame = +2 Query: 32 GGRVFRTRRRNGRNPGD 82 GGRVFR +R+G GD Sbjct: 212 GGRVFRRDKRHGGTAGD 228
2	**Luteinizing hormone receptor LHR**	**>Q71MM9_ONCMY** Length = 727 Score = 20.8 bits (42), Expect = 6.7 Identities = 9/20 (45%), Positives = 13/20 (65%) Frame = -3 Query: 141 VHTAQLGANDYTELRYYSVS 82 VH A+ N+ +LRY S+S Sbjct: 117 VHIARRTFNNLPKLRYLSIS 136
3	**Prolactin receptor**	**>Q9DE08_ONCMY** Length = 638 Score = 23.9 bits (50), Expect = 0.81 Identities = 8/18 (44%), Positives = 14/18 (77%) Frame = -2 Query: 120 EGRKADRYPGKRQGRNRR 67 EG +A+RYP ++QG+ + Sbjct: 592 EGAEAERYPTQQQGKTTK 609
4	**Growth hormone receptor isoform 1**	**>Q5I2A8_ONCMY** Length = 593 Score = 22.3 bits (46), Expect = 2.3 Identities = 9/19 (47%), Positives = 11/19 (57%) Frame = -2 Query: 92 ICPGIRPLRPAMYLDHVWI 36 I GI LRP +Y D W+ Sbjct: 302 ILGGIPDLRPDLYSDDPWV 320
5	**Somatostatin receptor type 1 subtype A and B**	**>Q5G547_ONCMY** Length = 371 Score = 21.2 bits (43), Expect = 5.1 Identities = 7/20 (35%), Positives = 13/20 (65%) Frame = -2 Query: 75 YIVLSYGKTPATRPFYGFLA 16 +++LSY + A YGF++ Sbjct: 286 FVILSYANSGANPILYGFVS 305

Continua…

6	**Follistatin**	**>Q3LRW7_SALSA** Length = 320 Score = 23.1 bits (48), Expect = 0.53 Identities = 8/16 (50%), Positives = 10/16 (62%) Frame = -2 Query: 154 CSSGGRSLWKKRQQRG 107 CS+G + LW R RG Sbjct: 251 CSAGKKCLWDARMSRG 266
7	**Activin receptor IIB**	**>A0N0F4_SALSA** Length = 481 Score = 19.2 bits (38), Expect = 7.7 Identities = 5/9 (55%), Positives = 7/9 (77%) Frame = -2 Query: 107 CCCELVYCS 81 CCCE +C+ Sbjct: 76 CCCEGNFCN 84
8	**Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide**	**>Q98SP4_ONCMY** Length = 138 Score = 20.8 bits (42), Expect = 9.4 Identities = 7/14 (50%), Positives = 10/14 (71%) Frame = -3 Query: 315 AEPMEKRQQRGLFT 274 +EP+ KR G+FT Sbjct: 87 SEPLSKRHSDGIFT 100

6 – DISCUSSÃO

As quatro bibliotecas de cDNA de *A. gigas* (MA, MJ, FA e FJ) foram construídas utilizando os mesmos procedimentos metodológicos. Porém, as bibliotecas de jovens (machos e fêmeas) apresentaram fragmentos maiores que os adultos, conforme figura 13. Entretanto, isso não impediu a identificação das EST's, pois assim como na metodologia SAGE (S*erial Analysis of Gene Expression*), onde o seqüenciamento de pequenos fragmentos de cDNA, chamados de tags, com 9 a 15 pb, é utilizado para identificar genes num tecido específico (Velculescu *et al.*, 1995), foi possível realizar a correta identificação dos genes mesmo a partir de fragmentos pequenos.

Observe que as bibliotecas de cDNA de *A. gigas* jovens (machos e fêmeas) apresentaram a maior quantidade de clones seqüenciados e, conseqüentemente, maior quantidade de seqüências válidas (figura 12), possibilitando maior representatividade dos transcritos nas bibliotecas dessas duas condições. Analisando as 3.857 seqüências geradas nas quatro bibliotecas (MA, MJ, FA e FJ), identificamos genes relacionados a diversas funções fisiológicas como metabolismo, transcrição, transdução, transporte, etc. Porém, alguns desses genes foram encontrados com freqüências diferentes nas quatro bibliotecas, conforme o perfil de expressão apresentado na figura 14.

A partir dessa abordagem, foi possível detectar genes expressos exclusivamente em adultos machos e fêmeas de *a. gigas*, como o receptor do hormônio de crescimento e seu inibidor, o receptor de somatostatina, o receptor do hormônio luteinizante e o polipeptídeo de ativação da pituitária adenilato ciclase.

A categorização das bibliotecas, realizada por meio da ferramenta *Gene Ontology* e utilizada para conhecer a ontologia dos genes encontrados, mostrou resultados interessantes que nos permitem diferenciar jovens e adultos de *A. gigas*, conforme tabela 4 e figura 15 (Macho Adulto), tabela 5 e figura 16 (Macho Jovem), tabela 6 e figura 17 (Fêmea Adulta) e tabela 7 e figura 18 (Fêmea Jovem).

A categoria Componente Celular mostrou o maior percentual dos genes identificados nas bibliotecas dos adultos, sendo 12,18% para os Machos Adultos e 10,84% para as Fêmeas Adultas. Enquanto para os jovens, os resultados foram bem diferentes, sendo 9,53% para os Machos Jovens e 6,12% para as Fêmeas Jovens. Porém, analisando a categoria Metabolismo, notamos que os resultados encontrados foram adversos ao anterior, apresentando maior percentual entre os jovens (Machos com 4,97% e Fêmeas 7,75%) do que entre os adultos (2,25% para os Machos e 2,48% para as Fêmeas).

Como na fase adulta as células reduzem sua velocidade de crescimento e atuam mais intensamente na manutenção de importantes processos fisiológicos, a categoria Citoesqueleto teve representação apenas nas bibliotecas de Machos Adultos (1,32%) e Fêmeas Adultas (1,93%), sendo que nos Machos Jovens e Fêmeas Jovens não houve representatividade dessa categoria. Em contrapartida, os genes Reguladores da Transcrição foram observados apenas entre os jovens, sendo 1,68% para os Machos Jovens e 1,39% para as Fêmeas Jovens.

Analisando de forma geral a ontologia dos genes encontrados nas quatro bibliotecas de *A. gigas*, percebemos claramente que as bibliotecas de Macho Adulto e Fêmea Adulta, diferem fortemente das bibliotecas de Macho Jovem e Fêmea Jovem. Isso nos permite afirmar que a expressão gênica em *A. gigas* se comporta de forma diferenciada entre adultos e jovens, mas de forma muito semelhante entre machos e fêmeas.

Uma análise detalhada dos genes expressos diferencialmente entre as quatro bibliotecas possibilitou a identificação de oito genes relacionados ao crescimento e à reprodução de *A. gigas*. Alguns desses genes tiveram sua via metabólica investigada e comparada com estudos realizados em outros vertebrados e até mesmo em alguns teleósteos.

Para que possamos compreender como esses genes atuam na regulação do crescimento e na reprodução de *A. gigas,* precisamos, primeiramente, abordar os aspectos relacionados à fisiologia reprodutiva dos peixes de uma maneira geral, para, posteriormente, compreendermos como o liga/desliga da síntese de diversos hormônios interfere no metabolismo, crescimento e reprodução de *A. gigas*.

Analisando a reprodução dos peixes, percebemos que eles são ótimos exemplos de complexidade reprodutiva, pois apresentam diferentes formas

anatômicas observadas nas gônadas, diferentes formas de liberação dos gametas para a fertilização externa (como a desova total ou parcelada), desenvolvimento de diferentes órgãos especializados para a fertilização interna (gonopódio, por exemplo), diferentes formas de cuidado com a prole (guardadores e não guardadores de ovos e larvas), além das diferentes formas de construções de ninhos e migração reprodutiva, como na “piracema” (Lowe-McConnell, 1999; Moyle & Cech, 2003)

Segundo Vazzoler (1996), para a preservação de uma espécie são importantes três atributos básicos: a alimentação, o crescimento e a reprodução. Dentre esses três atributos, somente a reprodução não atua apenas em nível individual (como a alimentação e o crescimento), pois ela é imprescindível para que as espécies se perpetuem.

A reprodução em peixes, apesar de ser modulada por fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura e as chuvas nas espécies de clima tropical, é também controlada endogenamente por um sistema endócrino, principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que sintetiza e libera gonadotropinas, esteróides gonadais e hormônios moduladores do processo reprodutivo, entre outras substâncias (Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006). Esse processo ocorre naturalmente com o desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e fertilização dos gametas, sendo que, em peixes, geralmente a desova e a fertilização ocorrem no ambiente externo (West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996). Os ovos fertilizados originam embriões e posteriormente larvas, que crescem e se tornam adultos, reiniciando o ciclo.

Os processos endógenos citados acima podem ser modulados de acordo com a estratégia reprodutiva selecionada, em relação à periodicidade na eliminação dos gametas e na quantidade e tamanho dos mesmos. Neste sentido, a qualidade dos ovos e das larvas está relacionada com a qualidade das reservas nutricionais disponíveis nos oócitos em desenvolvimento. Essas reservas oocitárias (vitelo) são mobilizadas a partir dos lipídios e proteínas armazenados em diversos tecidos, como o fígado, tecido adiposo e músculo (Moreira *et al*., 2002). A composição do alimento ingerido também é de grande importância no desenvolvimento das gônadas (principalmente nos ovários), levando a supor que a alteração da cadeia trófica certamente influenciará a qualidade e/ou quantidade de vitelo armazenado.

Nesse contexto, todo o controle endócrino deve ser alterado de alguma forma, quando espécies adaptadas ao ambiente natural, como *A. gigas*, são transferidas para o cativeiro, pois em ambiente confinado os peixes não conseguem eliminar os seus gametas de forma natural. Neste caso, intervenções hormonais exógenas em determinados níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas podem ser necessárias para dar continuidade ao processo reprodutivo, especialmente à maturação gonadal (Zohar & Mylonas, 2001). Assim, demonstra-se a importância de estudar o controle fisiológico do eixo-hipotálamo-hipófise-gônadas nas espécies nativas, ainda pouco investigadas, como é o caso de *A. gigas*.

Devido à quase ausência de estudos relacionados à fisiologia da reprodução de *A. gigas*, precisamos compreender quais mecanismos estão envolvidos na síntese de hormônios relacionados ao crescimento e à reprodução de peixes.

Tendo como base os oito genes selecionados que atuam no crescimento e reprodução de *A. gigas*, conforme tabela 9, constatamos que a grande maioria consiste de receptores hormonais (receptor de estrógenos, receptor da prolactina, receptor do hormônio luteinizante, receptor do hormônio de crescimento, etc) que atuam em tecidos-alvo, com papel fundamental na regulação da homeostase do indivíduo por meio da ligação a diversos hormônios.

O Receptor de Estrógeno (RE), encontrado com maior freqüência na biblioteca de cDNA de Macho Adulto de *A. gigas*, é um fator de transcrição que regula a expressão de seus genes-alvo por meio da ligação a seqüências específicas, chamadas de elementos de resposta a estrógenos, ou pela interferência em outros fatores de transcrição (Bardet *et al.*, 2002), atuando na ligação ao hormônio esteróide 17-β-estradiol em ambos os sexos, masculino e feminino (Enmark *et al*., 1997).

Duas isoformas do RE foram encontradas, clonadas e caracterizadas em várias espécies, inclusive de peixes, denominadas receptor de estrógeno α (REα) (Green *et al*., 1986), que foi encontrado com maior freqüência na biblioteca de cDNA de Macho Adulto de *A. gigas*, e o receptor estrogênico β (REβ) (Kuiper *et al*., 1996), que não foi observado em nenhuma das bibliotecas de *A. gigas*. Hawkins *et al*. (2000) descreveram um terceiro tipo de RE, o receptor de estrógeno γ, clonado do teleósteo *Micropogonias undulatus.* Apesar de estudos filogenéticos indicarem que

esse novo RE pode estar presente em outros teleósteos, não foi encontrado em nenhuma das bibliotecas de *A. gigas*.

O REα é predominantemente expresso em tecidos específicos. Entretanto, o REβ expressa em vários outros tecidos, inclusive nos mesmos em que o REα está presente (Kuiper & Gustafsson, 1997; Gustafsson, 1999).

Ambos os receptores ativam seus sítios promotores em resposta à presença do 17-β-estradiol, mas o REβ requer uma concentração aproximadamente cinco vezes maior de 17-β-estradiol do que o REα para que ocorra a atividade transcricional máxima. Contudo, o REβ é somente 30% tão eficiente quanto o REα em vários sistemas já testados (Pettersson e Gustafsson, 2001).

A estrutura genômica dos RE têm se mostrado altamente conservada nos últimos 400 milhões de anos desde que os teleósteos emergiram da última linhagem dos vertebrados, tanto que o número de éxons codificantes dos RE de *D. rerio* é idêntico aos RE de humanos, com exceção do éxon 9 do REβ de *D. rerio* (Lassiter *et al.*, 2002).

Em peixes, os estrógenos, hormônios que se ligam ao RE, influenciam o desenvolvimento desde a fase embrionária até a fase adulta, como foi mostrado em salmão (*Oncorhynchus keta*) (Jesus & Hirano, 1992) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Hines *et al.*, 1999). No cérebro, os estrógenos afetam a atividade neural e sua relação com importantes funções como comportamento reprodutivo e secreção de gonadotrofinas pela hipófise. Muitas das ações dos estrógenos são mediadas por meio da regulação transcricional de genes-alvo através da ligação a receptores nucleares intracelulares que fazem parte da família de RE (Ma *et al.,* 2000).

Outro receptor encontrado com muita freqüência na biblioteca de cDNA de Macho Adulto, com freqüência mediana na biblioteca de Fêmea Adulta e não encontrado nas bibliotecas dos jovens (MJ e FJ) de *A. gigas*, foi o Receptor do Hormônio Luteinizante (LHR). Para Dufau (1998), o gene LHR possui pouco mais de 70 kb, sendo formado por 11 éxons separados por 10 íntrons, todos localizados no domínio extracelular. Os éxons 1 a 10 codificam a região 5’ não traduzida e quase todo o domínio extracelular, enquanto que o éxon 11 codifica o resto do receptor, incluindo a região 3’. A organização do LHR é, geralmente, similar entre as espécies.

O LHR codifica uma glicoproteína que contêm 674 aminoácidos com duas unidades funcionais, uma delas é o domínio de ligação ao hormônio extracelular. O

LHR tem sido classicamente descrito no ovário e testículos para controle do processo reprodutivo (Zheng, 2001). A expressão do LHR é induzida pelo hormônio folículo-estimulante (FSH) e pelo próprio hormônio luteinizante (LH) (Dufau, 1998), conforme mapa metabólico do gene no anexo L.

O LHR é expresso principalmente em tecidos gonadais e sua ação nas células de Leydig e nos ovários tem sido extensivamente estudada em várias espécies (Dufau, 1998). Recente estudo realizado por Melo (2006), comparando a expressão dos hormônios folículo estimulante (FSH) e LH no peixe *Salminus hilarii* procedente de ambiente natural e de cativeiro, foi constatado que a expressão de FSH e LH em animais de cativeiro é menor em relação aos animais de ambiente natural. De acordo com Honji (2007), que também estudou a expressão FSH e LH no Characiformes *Salminus hilarii*, o padrão de distribuição das células gonadotrópicas na hipófise é diferente nos estádios do ciclo reprodutivo, sendo o número de células produtoras de FSH significativamente maior que as células produtoras de LH durante os primeiros estágios da espermatogênese e vitelogênese, já nos animais maduros, o número de células produtoras de LH excede o de células produtoras de FSH.

Estudos realizados no peixe marinho *Morone saxatilis*, mostraram que o perfil plasmático do LH em fêmeas capturadas no ambiente natural é superior aquele encontrado nos animais em cativeiro. No entanto, o conteúdo de LH na hipófise e a expressão de seu RNAm não diferem entre estes dois grupos de animais, sugerindo que o insucesso na reprodução possa ser devido a problemas na liberação do LH da hipófise para a circulação sangüínea (Bombardelli *et al.*, 2006).

Kobayashi *et al.* (2009), estudando expressão gênica no peixe hermafrodita *Trimma okinawae* por PCR em tempo real, observou que na fase fêmea, altos níveis de LHR e FSHR (receptor do hormônio folículo-estimulante) são encontrados nos ovários e apenas níveis basais nos testículos, enquanto na fase macho, a expressão do LHR e FSHR ocorre de forma inversa, ou seja, é maior nos testículos do que nos ovários, confirmando a importância desses receptores na regulação sexual dos peixes. Contudo, embora não tenhamos investigado a distribuição de LHR em diversos tecidos de *A. gigas*, ressaltamos que a ausência do LHR nas bibliotecas de jovens de *A. gigas* indica imaturidade gonadal e pode ser utilizado como um indicador da maturidade sexual de *A. gigas.*

O gene Receptor da Prolactina (RPRL), identificado apenas na biblioteca de cDNA de Fêmea Adulta de *A. gigas*, possui uma cadeia de polipeptídio com uma região transmembrana simples, onde a região extracelular contém cisteínas ligadas à pontes dissulfeto e sítios para glicosilação (Shibeli *et al.*, 1993).

O RPRL, com mapa metabólico no anexo N, possui considerável homologia (35%) com a superfamília de receptores do hormônio do crescimento (GH), que inclui os receptores de GH propriamente dito, de eritropoetina e interleucinas (Reber, 1993), sugerindo que eles originaram-se de um ancestral comum por meio de uma duplicação gênica (Kelly *et al.*, 1989). Segundo Sakai *et al*. (1984), a prolactina (PRL) e o GH se ligam aos mesmos receptores.

A PRL é secretada principalmente pela hipófise anterior, embora esteja presente em vários sítios extra-hipofisários, como no sistema imunológico (Ben-Jonathan *et al.,* 1996). Apesar de haver mais de 300 funções biológicas descritas para a PRL (Bole-Feysot *et al.*, 1998), a reprodução, a osmorregulação, o metabolismo de cálcio e o comportamento também são influenciados pela PRL (Chikanza, 1999). Contudo, sua função mais importante está na regulação do sistema imune, onde atua como hormônio imunomodulador.

Dois tipos de PRLR foram descritos em peixes, a forma clássica, chamada de PRLR ou PRLRα, e a forma descoberta recentemente, chamada de PRLRβ, com similaridade de 50% em suas seqüências. Apesar disso, o mecanismo de ação das duas isoformas apresenta-se bastante conservado, conforme observado em *D. rerio.* No mesmo estudo, ficou constatado que ambos os receptores são expressos ao longo do desenvolvimento, desde o estágio de zigoto até a fase adulta. Ensaios imunohistoquímicos indicaram a presença do PRLR em diversos órgãos e tecidos como olhos, cérebro, intestino, baço, rins, fígado, coração, músculos, órgãos olfatórios, ovários e testículos (Nguyen *et al.*, 2008).

Shiraishi *et al.* (1999) estudaram a expressão do RPRL na tilápia (*Oreochromis mossambicus*) em diversos estágios embrionários e larvais, comparando a expressão do receptor hormonal com o peixe exposto à água doce e água salgada. Nesse estudo, os níveis de RPRL foram mais altos em todos os estágios embrionários e larvais quando o peixe estava exposto à água doce do que à salgada. Por outro lado, nas bibliotecas de *A. gigas*, peixe essencialmente de água doce, o RPRL foi encontrado somente em fêmeas adultas e ainda com freqüência

mediana, tal fato pode estar relacionado com a presença de óvulos maduros nos ovários de algumas fêmeas no momento da captura, indicando a importância do RPRL e da PRL na fisiologia reprodutiva de fêmeas de *A. gigas*.

Outro gene com papel fundamental no crescimento dos peixes é o receptor do hormônio de crescimento (GHR), cujo mapa metabólico pode ser observado no anexo M. A expressão diferencial desse gene foi claramente observada a partir das análises por bioinformática, onde o GHR foi encontrado apenas nas bibliotecas de cDNA de adultos de *A. gigas*, tanto machos quanto fêmeas.

O GHR é formado por uma proteína com um domínio extracelular N-terminal por meio do qual liga-se ao hormônio do crescimento (GH) (Benedet *et al.*, 2005). O GH é secretado de maneira pulsátil pelas células somatotróficas localizadas na hipófise anterior (Ueland, 2004). Em peixes, sua secreção é regulada por dois hormônios hipotalâmicos, o hormônio liberador de GH, que é um regulador positivo, e a somatostatina (SST), um regulador negativo.

A detecção do GHR e do receptor de somatostatina (SSTR) apenas nas bibliotecas de cDNA de adultos de *A. gigas* (machos e fêmeas), evidencia a presença dos mecanismos de regulação do crescimento nesses peixes, conforme descrito na literatura. Entretanto, esperávamos encontrar também o GHR e o SSTR nos indivíduos jovens, o que não ocorreu. Porém, Borella *et al.* (2009), analisando imunocitoquimicamente o GH na hipófise de *A. gigas* com antisoro de salmão e pargo, obtiveram pouca reatividade com indivíduos jovens. Mais estudos serão necessários para esclarecer se ocorre a expressão do GHR e do GH em indivíduos jovens de *A. gigas* e em que nível.

Em recente estudo realizado por Toro *et al.* (2009), foram construídas bibliotecas de cDNA de hipófise e hipotálamo de *D. rerio* na fase adulta para realizar a comparação com embriões e larvas da mesma espécie. Nesse estudo, os autores encontraram diversos receptores hormonais como GHR, SSTR e receptor da prolactina (RPRL) que estavam presentes tanto na fase adulta quanto em embriões de *D. rerio.*

Em peixes, os locais de ligação do GH são brânquias, intestino, rim e gônadas (Peter & Marchant, 1995), sendo considerado o principal controlador do crescimento dos peixes, tendo sido isolado em vários teleósteos (Matty & Lone, 1985). O GH parece ter importância na regulação de várias funções fisiológicas

importantes, incluindo crescimento, apetite, metabolismo de proteínas e de lipídeos e maturação sexual, além de estar diretamente relacionado à síntese de outros hormônios (Benedet *et al.*, 2005).

Em vários peixes o GH também manifesta algumas funções que não são encontradas em todos os vertebrados, como a sua relação com a maturação sexual (Schalburg *et al.*, 2008). Em salmão (*Oncorhynchus kisutch e O. masou*) e truta (*O. mykiss),* duas isoformas de GHR foram encontradas, sendo denominadas de isoforma 1 e isoforma 2 (Benedet *et al.*, 2005). Em *A. gigas*, apenas a isoforma 1 (subtipos A e B) foi encontrada nas bibliotecas de adultos machos e fêmeas.

Very *et al.* (2005), estudando a expressão diferencial das isoformas de GHR em truta arco-íris, encontrou a isoforma 1 com maior freqüência no cérebro e a isoforma 2 no cérebro e fígado. A isoforma 1 foi mais abundante ou igual em muitos tecidos, exceto no pâncreas e baço, onde a isoforma 2 foi mais abundante. Os autores citam que a alta expressão desse receptor no cérebro é um indicativo de sua importância para o sistema nervoso central, mas os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos.

A similaridade das seqüências de GHR dos teleósteos com outros grupos de vertebrados é tão baixa quanto entre os grupos de teleósteos, variando entre 37 e 40%. Isto está de acordo com a longa história evolutiva dos peixes. Entretanto, o GHR de todas as espécies de vertebrados tem as mesmas características, com várias regiões importantes para ligação e ativação que foram bem conservadas ao longo dos anos (Benedet *et al.*, 2005).

Desde 2001, quando o primeiro cDNA de GHR foi clonado a partir dos peixes *Carassius auratus* (goldfish) e *Scophthalmus maximus* (turbot), o GHR foi seqüenciado em mais de 20 espécies de teleósteos, indicando a grande importância funcional desse receptor na fisiologia dos peixes (Benedet *et al.*, 2005).

Com freqüência semelhante ao GHR, o gene Receptor de Somatostatina (SSTR) foi encontrado também nas bibliotecas de adultos de *A. gigas*, machos e fêmeas. O SSTR foi originalmente descoberto de modo acidental durante estudos da distribuição de GH no hipotálamo de ratos, ficando constatada sua importância como inibidor da secreção de GH (Krulich *et al.*, 1968). O mapa metabólico do SSTR encontra-se no anexo L.

De acordo com Panetta *et al.* (1994), cinco subtipos de receptores de SSTR foram caracterizados em diversas espécies de vertebrados, inclusive peixes, SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4 e SSTR-5. Porém, todos são idênticos em 42 a 60% de sua seqüência de aminoácidos. Os SSTR's são altamente expressos em muitos tecidos, freqüentemente com muitos subtipos presentes na mesma célula (Patel, 1999).

Evidências indicam que o SSTR-1 (isoformas A e B), único encontrado na biblioteca de Macho Adulto e Fêmea Adulta de *A. gigas*, está diretamente relacionado à diminuição da progressão celular e angiogênese (formação de novos vasos sangüíneos) (Csaba, 2001).

Além do rudimentar conceito de que a somatostatina, que se liga ao SSTR, era um simples inibidor da secreção de GH, trabalhos realizados após sua descoberta mostraram que este hormônio possui várias outras funções, como inibição da secreção hormonal do hormônio tireoestimulante (TSH), adenocorticotrófico (ACTH), insulina e glucagon (Reichlin, 1983). No sistema nervoso central, atua como um neuromodulador, facilitando a regulação de neurotransmissores tais como a dopamina, neuroepinefrina e serotonina (Epelbaum, 1986); controla a proliferação celular normal, bem como em tecidos tumorais (Lamberts *et al.*, 1991; Schally, 1988) e apresenta potente ação imunomoduladora na atividade da secreção de células imunes como as imunoglobulinas produzidas pela ativação dos linfócitos B e produção de citoquinas pela atividade dos linfócitos T e macrófagos (Krantic *et al.*, 2004).

Outro hormônio que exerce papel fundamental na regulação do crescimento dos peixes, é a Folistatina, presente apenas na biblioteca de cDNA de Fêmea Adulta de *A. gigas*. Para compreendermos seu mecanismo de ação, precisamos, primeiramente, compreender a importância de outro hormônio, a ativina.

A ativina e a folistatina, formam um grupo de fatores interrelacionados cruciais para diversas funções reprodutivas e não reprodutivas em diversos organismos (Phillips, 2005). A ativina atua na regulação do sistema reprodutivo de peixes em diversos níveis do eixo hipófise-hipotálamo-gônadas (Muttukrishna *et al.*, 2004), especialmente na síntese de gonodotrofinas pelo hipotálamo e de FSH pela hipófise, regulando importantes processos como esteroidogênese, proliferação de espermatogônia, modulação dos receptores de FSH, desenvolvimento do folículo e

maturação (Wu *et. al.,* 2000). Foram encontrados dois tipos de receptores de ativina, *Activin Receptor Type I* (ActRI) e *Activin Receptor Type II* (ActRII), cujo mapa metabólico encontra-se no anexo O. A ativina se liga ao seu receptor do tipo II, ActRIIA e ActRIIB, sendo que este último foi encontrado exclusivamente nas bibliotecas de cDNA de jovens de *A. gigas* (Machos e Fêmeas), recruta, fosforila e conseqüentemente ativa o receptor do tipo I, ActRIA e ActRIB (Gaddy-kurten *et al.*, 1995).

Em peixes, o ActRIIB foi isolado pela primeira vez por Ge *et al.* (1997) a partir do ovário de *goldfish* (*Carassius auratus*). Além do ovário, o receptor foi encontrado também nas brânquias, cérebro, hipófise, coração, músculos, fígado, rim e testículos, mostrando a expressão mais elevada desse receptor no ovário, em comparação a outros tecidos, indicando a importância do ActRIIB no ovário de *goldfish*.

A partir de então estudos indicaram a importância do ActRII no aumento de massa muscular de vários peixes como *pufferfish* (*Lagocephalus laevigatus*), salmão do Atlântico (*S. salar*), *goldfish* (*C. auratus*) e *zebrafish* (*D. rerio*), mas o primeiro estudo mostrando as funções de ActRIIB para o crescimento em peixes foi realizado por Wu *et al.* (2000) através da injeção intraperitoneal de ActRII em juvenis de *goldfish*, bagre africano (*C. gariepinus*) e tilápia (*O. aureus*), onde obtiveram aumento no crescimento muscular por hiperplasia entre 32 e 40% e aumento no teor de proteína total.

Em muitos tecidos, a ativina é expressa juntamente com a folistatina (FST) que é uma glicoproteína monomérica que se liga de forma irreversível a ativina, formando complexos inativos (Hill *et al.,* 2002; Sidis *et al,* 2002). A FST neutraliza a ação da ativina prevenindo a interação da ativina com o seu receptor (ActRII) e aumentando a sua degradação pelas células (Wu *et al.*, 2000). Para Muttukrishna *et al.* (2004) a FST antagoniza também a ação de vários outros membros da superfamília dos fatores de crescimento β (TGF-β).

Em recente estudo sobre a FST do peixe *Sparus aurata*, Funkenstein *et al.* (2009) afirmam que a presença de FST em embriões de *S. aurata* confirma a sua importância durante o desenvolvimento embrionário, pois além de sua ação endócrina de inibição da síntese de FSH, estudos recentes têm indicado que a FST atua em outras áreas além do sistema reprodutivo, neurônios, crescimento muscular

e desenvolvimento. A estrutura da FST de *S. aurata* é altamente conservada em comparação com a FST de outros vertebrados, incluindo outros peixes, anfíbios, aves e mamíferos.

Com expressão apenas nas bibliotecas de cDNA de adultos de *A. gigas*, tanto machos quanto fêmeas, o Polipeptídeo de Ativação da Pituitaria Adenilato Ciclase (PACAP), pertencente à superfamília dos receptores de proteína G, foi inicialmente purificado a partir de tecidos hipotalâmicos de ovinos, mostrando potente ação no estímulo da produção de cAMP pela hipófise (Miyata *et al.*, 1989; 1990). Atualmente o PACAP é considerado um neuropeptídeo que regula as funções da hipófise, atuando também na sobrevivência dos neurônios, neurotransmissão, vasodilatação e motilidade intestinal (Wong *et al.*, 2005), além de aumentar a secreção de GH e de gonadotrofinas (Wong *et al.*, 2000), tirotrofinas (Okada *et al.*, 2006) e prolactina (Rawlings e Hezareh, 1996).

O PACAP foi encontrado e isolado em várias espécies de peixes como salmão (Wong *et al*., 2000), carpa (Wong *et al*., 2005), *goldfish* (Wong *et al.*, 1998), *zebrafish* (Wang *et al.*, 2003; Toro *et al.*, 2009), *Sparus auratus* (Cardoso *et al.*, 2007), *Torpedo marmorata* (Valiante *et al.*, 2006) e *Fugu rubripes* (Cardoso *et al.*, 2007). No caso do salmão, a clonagem molecular de PACAP revelou que o hormônio de liberação do GH e o PACAP são codificados no mesmo gene (Wong *et al.*, 2005), sendo o PACAP considerado um potente secretor de GH em peixes ósseos (Wong *et al.*, 2000).

Valiante *et al.* (2006), estudando a distribuição do PACAP no peixe cartilaginoso *T. marmorata,* constataram grande expressão do PACAP no cérebro, sugerindo um papel importante na fisiologia dos peixes cartilaginosos, principalmente na regulação endócrina por meio da atividade da hipófise. Em *zebrafish*, o PACAP foi encontrado desde a fase embrionária, com 24 horas após a fertilização, até a fase adulta, confirmando a sua importância no crescimento e na regulação hormonal dos peixes (Toro *et al.*, 2009). Porém, não encontramos o PACAP nas bibliotecas de jovens de *A. gigas*, apenas em adultos. Entretanto, mais estudos serão necessários para confirmar se a não detecção do PACAP em indivíduos jovens ocorreu devido às limitações da metodologia utilizada ou ao fato de a expressão do PACAP ocorrer de forma diferenciada em teleósteos primitivos, como é o caso de *A. gigas*.

Contudo, estudos sobre interações entre diversos hormônios e seus receptores, principalmente relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, são escassos mesmo em espécies de clima temperado e raros em teleósteos de clima tropical. O processo de reprodução artificial de diversas espécies de peixe apresenta sérios problemas que levam a disfunções do processo reprodutivo, como ausência de vitelogênese, maturação final dos ovócitos em fêmeas e reduzida capacidade de realizar a espermatogênese e espermiação nos machos, levando a produção de sêmen de baixa quantidade e qualidade (Zohar & Mylonas, 2001).

Além de *A. gigas*, um grande número de espécies de peixes pode receber algum tipo de tratamento hormonal para acelerar o crescimento e controlar ou induzir a reprodução. Apesar de técnicas de manipulação hormonal serem empregadas atualmente com sucesso em diversas espécies, alguns problemas têm sido evidenciados, como o fato do animal estar em estágio de desenvolvimento gonadal avançado e as múltiplas aplicações hormonais necessárias para atingir o sucesso na reprodução (Zohar & Mylonas, 2001).

As características únicas encontradas em *A. gigas*, tornam a espécie um importante elo entre os antigos peixes ósseos e os teleósteos derivados. Por isso, o estudo de peixes primitivos, como *A. gigas*, possibilita conhecer as transformações que ocorreram nos teleósteos através dos tempos, especialmente àquelas relacionadas ao controle endócrino exercido pela hipófise sobre o crescimento e a reprodução. Entender como ocorre o controle endócrino em *A. gigas* é o ponto chave para acelerar seu crescimento e possibilitar a reprodução em cativeiro. No entanto, os resultados aqui apresentados nos indicam um caminho que deve ser seguido a fim de compreendermos os mecanismos envolvidos na fisiologia molecular do crescimento e da reprodução em *A. gigas*.

7 – CONCLUSÕES

- A construção de bibliotecas de EST's mostrou-se uma técnica poderosa para a identificação de novos transcritos expressos diferencialmente em machos, fêmeas, adultos e jovens de *A. gigas*.

- A identificação de 139 genes diferencialmente expressos nas quatro bibliotecas contribuiu para a elucidação de mecanismos genéticos envolvidos no crescimento e na reprodução de *A. gigas.*

- A partir dos 139 genes diferencialmente expressos nas quatro bibliotecas analisadas, foi possível identificar oito genes relacionados ao crescimento e à reprodução de *A. gigas,* sendo receptor de estrógeno, receptor do hormônio luteinizante, receptor da prolactina, receptor da isoforma 1 do hormônio de crescimento, receptor da somatostatina tipo 1 subtipos A e B, folistatina, receptor da ativina IIB e polipeptídeo de ativação da pituitária adenilato ciclase. Esses genes podem agora ser utilizados para diversos estudos quantitativos e qualitativos de expressão gênica.

- As diferenças observadas, por meio da ontologia dos genes encontrados nas quatro bibliotecas, indicam que a expressão gênica em *A. gigas* ocorre de forma diferenciada entre adultos e jovens (categorias citoesqueleto, metabolismo e regulador da transcrição), mas de forma muito semelhante entre machos e fêmeas (categorias função molecular, componente celular e processo biológico).

- Os resultados do presente estudo representam contribuições importantes para o conhecimento das características genéticas relacionadas ao crescimento e à reprodução de *A. gigas*, além de servirem de base para outros estudos visando melhorias na criação em cativeiro.

8 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos contribuíram para a elucidação de muitas dúvidas relacionadas à fisiologia molecular do crescimento e da reprodução em *A. gigas*. Porém, devido a robustez dos resultados obtidos, surgiram questionamentos que necessitam ser esclarecidos em estudos posteriores:

- Por meio da metodologia de PCR em tempo real, quais são os níveis de expressão dos oito genes relacionados ao crescimento e à reprodução em adultos, jovens, machos e fêmeas de *A. gigas*?

- Quais as conseqüências causadas pelo silenciamento dos principais genes que atuam no crescimento e na reprodução de *A. gigas*?

- Quais vias metabólicas podem ser alteradas, a partir da administração de um ou mais hormônios, com o propósito de acelerar o crescimento e a reprodução de *A. gigas*? Em que dosagem?

- O nível de algum receptor ou hormônio pode ser utilizado pelo piscicultor na discriminação do sexo de juvenis de *A. gigas*? Qual?

- Em *A. gigas*, quais genes e hormônios poderiam contribuir na redução do estresse causado pela criação em cativeiro?

- Que características genéticas devem ser consideradas pelo piscicultor para a seleção de matrizes de *A. gigas*, visando a produção de alevinos em cativeiro?

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology,* 215, 403-10.

Amar, A. P. & Weiss, M. H. 2003. Pituytary anatomy and physiology. *Neurosurg. Clin. Am., 13: 11-23.*

Anderson, K. V.; Ingham, P. W. 2003. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nature Genetics,* 33: 285-293.

Barbazuk, W.B.; Korf, I.; Kadavi, C.; Heyen, J.; Tate, S.; Wun, E.; Bedell, J. A.; McPherson, J.D.; Johnson, S. L. 2000. The syntenic relationship of the Zebrafish and humam genomes. *Gen. Res.,* 10: 1351-1358.

Bardet, P. L.; Horard, B.; Robinson-Rechavi, M.; Laudet, V.; Vanacker, J. M. 2002. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Molecular Endocrinology,* 28: 153-163

Bartlett, G. R. 1978. Phosphates in red cells of two South Amarican osteoglossids: *Arapaima gigas* and *Osteoglossum bicirrhosum. Canadian Journal Zoology*, 56: 878-881.

Benedet, S.; Johansson, V.; Sweeney, G.; Galay-Burgos, M.; Bjornsson. 2005. Cloning of two Atlantic salmon growth hormone receptor isoforms and in vitro ligand-binding response. Fish *Physiology and Biochemistry*, 31: 315-329

Ben-Jonathan, N.; Mershon, J. L.; Allen, D. L.; Steinmetz, R. W. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr. Rev*., 17: 639-69.

Blázquez, M.; Bosma, P. T.; Fraser, E. J.; Van Look, K. J. W. & Trudeau, V. L. 1998. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comparative Biochemistry and Physiology* (C) 119: 345-364.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction, pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev*., 19: 225-68.

Bombardelli, R. A.; Syperreck, M. A.; Sanches, E. A. 2006. Hormonio liberador de gonadotrofinas em peixes: aspectos básicos e suas aplicações. *Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, 9: 1, 59-65.

Borella, M. A.; Venturieri, R. L. L.; Batlouni, S. R.; Mancera, J. M. 2006. Aspectos morfofisiológicos comparativos da hipófise de Osteoglossídeos. *In*: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C. (Eds). *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura*. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. Jaboticabal/SP. p. 53 - 65.

Borella, M. A.; Venturieri, R. L. L.; Mancera, J. M. 2009. Immunocytochemical of adenohypophyseal cells in the pirarucu *(Arapaima gigas)*, an Amazonian basal teleost. *Fish Physiol. Biochem*., 35: 3-16.

Brandão, F. R.; Gomes, L. C.; Chagas, E. C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36(3): 349-356.

Brauner, C. J.; Matey, V.; Wilson, J. M.; Bernier, N. J.; Val, A. L. 2004. Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. *Journal of Experimental Biology*, 207(9): 1433-1438.

Broughton, R. E.; Milan, J. E.; Roe, B. A. 2001. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.* 11, 1958-1967.

Cardoso, J. C. R.; Vet, E. C. J. M.; Louro, B.; Elgar, G.; Clark, M. S.; Power, D. M. 2007. Persistence of duplicated PAC1 receptors in the teleost, *Sparus auratus BMC Evolutionary Biology*, 7:221.

Cavero, B. A. S.; Ituassú, D. R.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Bordinhon, A. M.; Fonseca, F. A. L.; Ono, E. A. 2003a. Uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(8): 1011-1015.

Cavero, B. A. S.; Roubach, R.; Pereira-Filho, M.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2002. Potential for Cage culture of pirarucu (*Arapaima* gigas) in the Amazon Region. *Global Aquaculture Advocate*, 5(5): 59-60.

Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003b. Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(6): 723-728.

Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003c. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(1): 103-107.

Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Bordinhon, A. M.; Fonseca, F. A. L.; Ituassú, D. R.; Roubach, R; Ono, E. A. 2004. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(5): 513-516.

Chikanza, I. C. 1999. Prolactin and neuroimmunomodulation: *in vitro* and *in vivo* observations. *Ann N Y Acad Sci*, 876: 119-30.

Crescêncio, R. 2001. *Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1929), utilizando atrativos alimentares.* Dissertação de Mestrado, INPA-UFAM, Manaus, Amazonas. 35pp.

Crescêncio, R.; Ituassú, D. R.; Roubach, R.; Pereira-Filho, M.; Cavero, B. A. S.; Gandra, A. L. 2005. Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(12): 1217-1222.

Csaba, Z.; Dournaud, P. 2001. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*, 35: 1-23.

Dooley, K.; Zon, L. I. 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Op. Genet. Dev.* 10, 252-256.

Dufau, M. L. 1998. The luteinizing hormone receptor. *Annual Reviews Physiological*, 60: 461-496.

Enmark, E.; Pleto-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J. G.; Nordenskjold, M.; Gustafsson, J. A. 1997. Human estrogen receptor b-gene structure, chromossomal localization, and expression pattem. J Clin Endocrinol Metab, 82(12): 4258-4265.

Epelbaum J. 1986. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modification. *Prog. Neurobiol*., 27: 63-100.

Ewing, B.; Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, Cold Spring Harbour, 8(3): 186-194.

Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. C.; Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, Cold Spring Harbour, 8(3): 175-185.

Farias, I. P., Hrbek, T., Brinkmann, H., Sampaio, I. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 3: 128-130.

Funkenstein, B.; Rebhan, Y.; Skopal, T. 2009. Molecular cloning and characterization of follistatin in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Molecular Biology Reproduction*, 36: 501–511.

Gaddy-Kurten, D.; Tsuchida, K.; Vale, W. 1995. Activins and the receptor serine kinase superfamily. *Recent Prog Horm Res,* 50: 109-29.

Gandra, A. L.; Ituassú, D. R.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Crescêncio, R.; Cavero, B. A. S. 2007. Pirarucu growth under different feeding regimes. *Aquaculture International*, 15: 91-96.

Ge, W.; Tanaka, M.; Yoshikuni, M.; Eto, Y.; Nagahama, Y. 1997. Cloning and characterization of goldfish activin type IIB receptor. *J. Mol. Endocrinol.*, 19: 47-57.

Gomes, L. C.; Chagas, E. C.; Brinn, R. P.; Roubach, R.; Coppati, C. E.; Baldisserotto, B. 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu jeveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture*, 256: 521-528.

Green, S.; Walter, P.; Kumar, V.; Krust, A; Bornert, J. M.; Argos, P.; Chambon, P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to

Green, P. 1999. *Documentation for PHRAP and Cross_match (version 0.990319)*. http://www.phrap.org/phrap.docs/phrap.html

Gustafsson, J. A. 1999. Estrogen receptor beta-a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*, 163(3): 379-383.

Haider, S. G. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology* 233: 181-241.

Hawkins, M. B.; Thornton, J. W.; Crews, D.; Skipper, J. K.; Dotte, A.; Thomas, P. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *PNAS*, 97: 10751-10756.

Hill, D. P.; Davis, A. P.; Richardson, J. E. 2001. Strategies for Biological Annotation of Mammalian Systems: Implementing Gene Ontologies in Mouse Informatics. *Genomics*, San Diego, 74: 121-128.

Hill, J. J.; Davies, M. V.; Pearson, A. A.; Wang, J. H.; Hewick, R. M.; Wolfman, N. M.; Qiu, Y. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem*, 277(43): 40735–41.

Hines, G. A.; Boots, L. R.; Wibbels, T.; Watts, S. A. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: cyprinoidei). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 114: 235-248.

Honji, R. M. 2007. *Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo databarana Salminus hilarii (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativeiro.* Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 190p.

Hrbek, T.; Farias, I. P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J. I.; Meyer, A. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, 8: 297-308.

Huang, X.; Madan, A. Cap3: A DNA sequence assembly program. 1999. *Genome Research*, Cold Spring Harbour, 9(9): 868-877.

Imbiriba, E. P. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*, 31(2): 299-316.

Isaacks, R. E.; Kim, H. D., Bartlett, G. R.; Harkness, D. R. 1977. Inositol pentaphosphate in erythrocytes of a fresh water fish pirarucu (*Arapaima gigas)*. *Life Science*, 20: 987-990.

Jesus, E. G.; Hirano, T. 1992. Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 85: 55-61.

Kawauchi, H. & Sower, S. A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *General and Comparative Endocrinology*. 148: 3-14.

Kelly, P. A.; Boutin, J. M.; Jolicoeur, C.; Okamura, H.; Shirota, M.; Edery, M.; Dusanter-Four, I.; Djiane, J. 1989. Purification, cloning, and expression of the prolactin receptor. *Biol Reprod.*, 40 (1): 27-32.

Kobayashi, Y.; Nakamura, M.; Sunobe, T.; Usami, T.; Kobayashi, T.; Manabe, H.; Paul-Prasanth, B.; Suzuki, N.; Nagahama, Y. 2009. Sex change in the gobiid fish is mediated through rapid switching of gonadotropin receptors from ovarian to testicular portion or vice versa. *Endocrinology*, 150(3): 1503-1511.

Krantic, S.; Goddard, I.; Saveanu, A.; Giannetti, N.; Fombonne, J.; Cardoso, A.; Jaquet, P.; Enjalbert, A. 2004. Review: Novel modalities of somatostatin actions. *Eur J Endocrinol.*, 151: 643-55.

Krieg, S. A.; Krieg, A. J.; Shapiro, D. J. 2001. A unique downstream estrogen responsive unit mediates estrogen induction of proteinase inihibitor-9, a cellular inhibitor of il-1beta converting enzyme (caspase 1). *Molec. Endocrinol.*, 15: 1971-1982.

Krulich, L.; Dhariwal, A. P.; McCann, S. M. 1968. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, 83: 783-90.

Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad*

Kuiper, G. G.; Gustafsson, J. A. 1997. The novel estrogen receptor β subtype: potential role in the cell-and promoter- specific actions of estrogens and antiestrogens. *FEBS Lett,* 410 (1): 87-90.

Lamberts, S. W.; Krenning, E. P.; Reubi, J. C. 1991. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr. Rev.*12: 450-82.

Lassiter, C. S.; Kelley, B.; Linney, E. 2002. Genomic structure and embryonnic expression of estrogen receptor beta a (ERba) in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*, 299: 141-151.

Lavoué, S.; Sullivan, J. P. 2004. Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypotesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 171-185.

Liu, Z. J. & Cordes, J. F. (2004). Rewiew: DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.

Lopes, M. I. 2005. Análise das etiquetas de genes expressos (ESTs) de uma cepa de *Aspergillus niger em condições de depleção e não depleção para nitrogênio*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. 80 pp.

Lowe-McConnell, R. H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. EDUSP. 534p.

Ma, C. H.; Dong, K. W.; Yu, K. L. 2000. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor β-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochimica et Biophysica Acta,* 1490: 145-152.

Marques, D. C. S. 2003. *Caracterização genética do pirarucu Arapaima gigas (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia Estado do Mato Grosso*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 66pp.

Martinelli, N. M. C.; Petrere Jr, M. 1999. Morphometric relationships and indirect determination of the length frequency structure of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), in Brazilian Amazonia. *Fisheries Management and Ecology*, 5: 233-240.

Matty, A. J.; Lone, K. P. 1985. Hormonal control of protein deposition. In: Cowey, C. B.; A. M. MacKie; Bell, J.G. (eds). *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, New York.

Melo, R. G. 2006. *Caracterização da expressão do RNAm das gonadotropinas de Salminus hilarii (Characiformes: Characidae) ao longo do ciclo reprodutivo: efeitos do bloqueio reprodutivo*. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Mogi das Cruzes. 58p.

Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., Coy, D.H., 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 567–574.

Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., Arimura, A., 1990. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 170, 643–648.

Moncaut, N.; Lo Nostro, F. & Maggese, M. C. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17β. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology* 63: 127-137.

Moreira, R. G.; Venturieri, R. L. L.; Mimura, O. M., 2002. Lipid and protein alteration in the liver and plasma of the migratory teleost *Salminus maxillosus* during the reproductive cycle. *Journal Aquaculture in the Tropics* 17: 209-219.

Moyle, P. B. & Cech, J. J. 2003. *Fishes. An introduction to ichthyology*. Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey. 590p.

Muttukrishna, S.; Tannetta, D.; Groome, N.; Sargent, I. Activin and follistatin in female reproduction. 2004. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 225: 45–56.

Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology* 38: 217-229.

Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the world*. 3 ed, John Wiley & Sons. 600 pp.

Nguyen, N.; Stellwag, E. J.; Zhu, Y. 2008. Prolactin-dependent modulation of organogenesis in the vertebrate: recent discoveries in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiolog, Part C*, 148: 370-380.

Ochoa, A. I. S.; Galeano, I. C. B.; Daza, P. V. 2005. *Biología y cultivo del pirarucu Arapaima gigas (Schinz, 1822) (Pisces: Arapaimidae): bases para un aprovechamiento sostenible*. Instituto Colombiano de Desarollo Rural e Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, COL. 109pp.

Okada, R., Yamamoto, K., Ito, Y., Chartrel, N., Leprince, J., Fournier, A., Vaudry, H., Kikuyama, S., 2006. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide, and somatostatin on the release of thyrotropin from the bullfrog pituitary. *Ann. NY Acad. Sci.,* 1070, 474-480.

Oliveira, V.; Poleto, S. L.; Venere, P. C. 2005. Feeding of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae*)* in their natural environment, lago Quatro Bocas, Araguaina-MT, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3(2): 312-314.

Ono, E. A.; Halverson, M. R.; Kubitza, F. 2004. Pirarucu, o gigante esquecido. *Panorama da Aqüicultura*, 14(81): 14-25.

Panetta. R.; Greenwood, M. T.; Warszynska, A.; Demchyshyn, L. L.; Day, R.; Niznik, H. B.; Srikant, C. B.; Patel, Y. C. 1994. Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin–28. *Mol. Pharmacol*., 45: 417-27.

Patel, C. Y. 1999. Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology,* 20: 157-198.

Pereira-Filho, M.; Cavero, B. A. S.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003. Cultivo do pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. *Acta Amazonica*, 33(4): 715-718.

Pertea, M.; Salzberg, S. L. 2002. Computacional gene finding in plants. *Plant Molecular Biology,* 48(1-2): 39-48.

Peter, R. E.; Marchant, T. A. 1995. The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture*, 129: 299-321.

Pettersson, K.; Gustafsson, J. A. 2001. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.,* 63: 165-92.

Phillips, D.J. 2005. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol*, 28(1): 1-16.

Prosdocimi, F.; Cerqueira, G. C.; Binnec, E.; Silva, A.; Reis, A. N.; Junqueira, A. C. M.; Santos, A. C. F.; Nhani Júnior, A.; Wust, C. I.; Filho, F. C.; Kessedjian, J. L.; Petretski, J. H.; Camargo, L. P.; Ferreira, R. G. M.; Lima, R. P.; Pereira, R. M.; Jardim, S.; Sampaio, V. S.; Folgueiras-Flatschart, A. V. 2003. Bioinformática: Manual do usuário. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 29: 12-25.

Prosdocimi, F.; Faria-Campos, A. C.; Peixoto, F. C.; Pena, S. D. J.; Ortega, J. M.; Franco, G. R. 2002. Clustering of *Schistossoma mansoni* mRNA sequences and analysis of the most transcribed genes: implications in metabolism and biology of different developmental stages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95(1): 61-69.

Rawlings, S.R., Hezareh, M., 1996. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr. Rev.* 17, 4-29.

Reber, P. M. 1993. Prolactin and Immunomodulation. *Am. J. Med.*, 95: 637-644.

Reichlin S. 1983. Somatostatin. *N Engl J Med*; 309: 1495-501.

Rodrigues, M. C. 2001. *Descoberta de genes do carrapato bovino, Boophilus microplus (Canestrinne, 1887), a partir da análise de ESTs (expressed sequence tags) de ovário*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, DF. 119 pp.

Sakai, S.; Katoh, M.; Berthon, P.; Kelly, P. A. 1984. Characterization of prolactin receptors in pig mammary gland. *Biochemichal Journal.*, 224 (3): 911-922.

Salvo-Souza, R. H.; Val, A. L. 1990. O gigante das águas doces. *Ciência Hoje*, 11(64): 9-12.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniats, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Schalburg, K. R.; Yazawa, R.; Boer, J.; Lubieniecki, K. P.; Goh, B.; Straub, C. A.; Beetz-Sargent, M. R.; Robb, A.; Davidson, W. S.; Devlin, R. H.; Koop, B. F. 2008. Isolation, characterization and comparison of Atlantic and Chinook salmon growth hormone 1 and 2. *BMC Genomics*, 9: 522.

Schally, A. V. 1988. Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res.* 48: 6977-85.

Scorvo-Filho, J. D.; Rojas, N. E. T.; Silva, C. M.; Konoike, T. 2004. Criação de *Arapaima gigas* (Teleostei Osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no estado de São Paulo. *B. Inst. Pesca*, 30(2): 161-170.

Shibeli, V.; Rokkones, E.; Gautyik, K. M. 1993. Growth Homone and prolactin receptors belong to a new receptor family. Biological and Medical Aspects. *Tidsskr. Nor. Laegeforen*, 113 (6): 725-730.

Shiraishi, K.; Matsuda, M., Mori, T.; Hirano, T. 1999. Changes in expression of prolactin- and cortisol-receptor genes during early-life stages of euryhaline tilapia (*oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater. *Zoological Science*, 16: 139-146.

Sidis, Y.; Tortoriello, D. V.; Holmes, W. E.; Pan, Y.; Keutmann, H. T.; Schneyer, A. L. 2002. Follistatin-related protein and follistatin differentially neutralize endogenous *vs*. exogenous activin. *Endocrinology*, 143(5): 1613-24.

Toro, S.; Wegner, J.; Muller, M.; Westerfield, M.; Varga, Z. M. 2009. Identification of differentially expressed genes in the zebrafish hypothalamus–pituitary axis. *Gene Expression Patterns*, 9: 200-208.

Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287-318.

Ueland T. 2004. Bone metabolism in relation to alterations in systemic growth hormone. *Growth Horm IGF Res.,* 14: 404-17.

Val, A. L.; Honczaryk, A. 1995. *Criando Peixes na Amazônia*. Manaus: MCT/INPA. 160pp.

Val, A. L.; Affonso, E.G.; Salvo-Souza, R. H.; Almeida-Val, V. M. F.; Moura, M. A. F. 1991. Inositol pentaphosphate in the erythrocytes of an Amazon fish, the pirarucu (*Arapaima gigas*). *Canadian Journal of Zoology*, 70: 852-855.

Val, A. L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125A: 417-435.

Valiante, S.; Prisco, M.; Ricchiari, L.; Laforgia, V.; Varano, L.; Andreuccetti, P. 2006. Distribution of PACAP in the brain of the cartilaginous fish *Torpedo Marmorata. Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1070: 591-596.

Vascotto, S. G.; Beckham, Y.; Kelly, G. M. 1997. The zebrafish swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem. Cell. Biol.* 75, 479-485.

Vazzoler, A. E. A. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá. 169p.

Vedoy, C. G.; Bengston, M. H.; Sogayar, M. C.; 1999. Hunting for differentially expressed genes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 877-884.

Velculescu, V. E.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science,* 270 (5235): 484-7.

Very, N. M.; Kittilson, J. D.; Norbeck, L. A.; Sheridan, M. A. 2005. Isolation, characterization, and distribution of two cDNAs encoding for growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. B. 140: 615-628.

Vettore, A. L.; Silva, F. R.; Kemper, E. L.; Arruda, P. 2001. The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4): 1-7.

Wang, Y.; Wong , A. O.; Ge, W. 2003. Cloning, regulation of messenger ribonucleic acid expression, and function of a new isoform of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the zebrafish ovary. *Endocrinology* 2003, 144(11): 4799-4810.

Weltzien, F. A.; Andersson, E.; Andersen, Ø.; Shalchian-Tabrizi, K. & Norberg, B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 137: 447-277.

West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. *Australian Journal Marine & Freshwater Research* 41: 199-222.

Wong, A. O. L.; Leung, M. Y.; Shea, W. L. C.; Tse, L. Y.; Chang, J. P.; Chow, B. K. C. 1998. Hypophysiotropic Action of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide PACAP) in the Goldfish: Immunohistochemical Demonstration of PACAP in the Pituitary, PACAP Stimulation of Growth Hormone Release from Pituitary Cells, and Molecular Cloning of Pituitary Type I PACAP Receptor. *Endocrinology*, 139 (8).

Wong, A. O.; Li, W. S.; Lee, E. K.; Leung, M. Y.; Tse, L.Y.; Chow, B. K.; Lin, H. R.; Chang, J. P. 2000. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell Biol.*, 78, 329-343.

Wong, A. O. L.; Li, W.; Leung, C. Y.; Huo, L.; Zhou, H. 2005. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp. I. Functional Coupling of cyclic adenosine 3_,5_-monophosphate and Ca2_/calmodulin-dependent signaling pathways in PACAP-induced GH secretion and GH gene expression in grass carp pituitary cells. *Endocrinology* 146(12): 5407-5424.

Wu, T.; Patel, H.; Mukai, M.; Melino, C.; Garg, R.; Ni, X.; Chang, J.; Peng, C. (2000). Activin, inhibin, and follistatin in zebrafish ovary: expression and role in oocyte maturation. *Biology of reproduction*, 62: 1585-1592.

Xie, H.; Wasserman, A.; Levine, Z.; Novik, A.; Grebinskiy, V.; Shoshan, A.; Mintz, L. 2002. Large-scale protein annotation trhough gene ontology. *Genome Research*, (12), 785-794.

Zheng, M.; Shi, H.; Segaloff, D. L.; Voorhis, B. J. V. 2001. Expression and Localization of Luteinizing Hormone Receptor in the Female Mouse Reproductive Tract. *Biology of Reproduction*, 64: 179-187.

Zohar, Y. & Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture,* 197: 99-136.

Zweiger, G.; Scott R. W. 1997. From expressed sequence tags to 'epigenomics': anunderstanding of disease processes. *Curr Opin Biotechnol Review*. 8(6): 684-7.

10 - ANEXOS

Anexo A. Autorização para coleta dos exemplares de *Arapaima gigas* utilizados na construção das bibliotecas de cDNA.

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16227-1	Data da Emissão: 25/08/2008 11:38	Data de Validade: 25/08/2009

Dados do titular

Registro no Ibama: 2787280	Nome: Marcos Prado Lima	CPF: 710.624.592-53
Título do Projeto: Genômica e proteômica do pirarucu (Arapaima gigas) em fase de reprodução e exposto a desafios ambientais		
Nome da Instituição : INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA		CNPJ: 01.263.896/0015-60

SISBIO

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites. Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	FONTE BOA	AM	Reserva EcolÃ³gica MamirauÃ¡	UC Estadual

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Arapaima gigas
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Arapaima gigas
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Arapaima gigas (*Qtde: 32)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Peixes)	Tarrafa, Arbalete e arpão (mergulho autônomo)

Destino do material biológico coletado

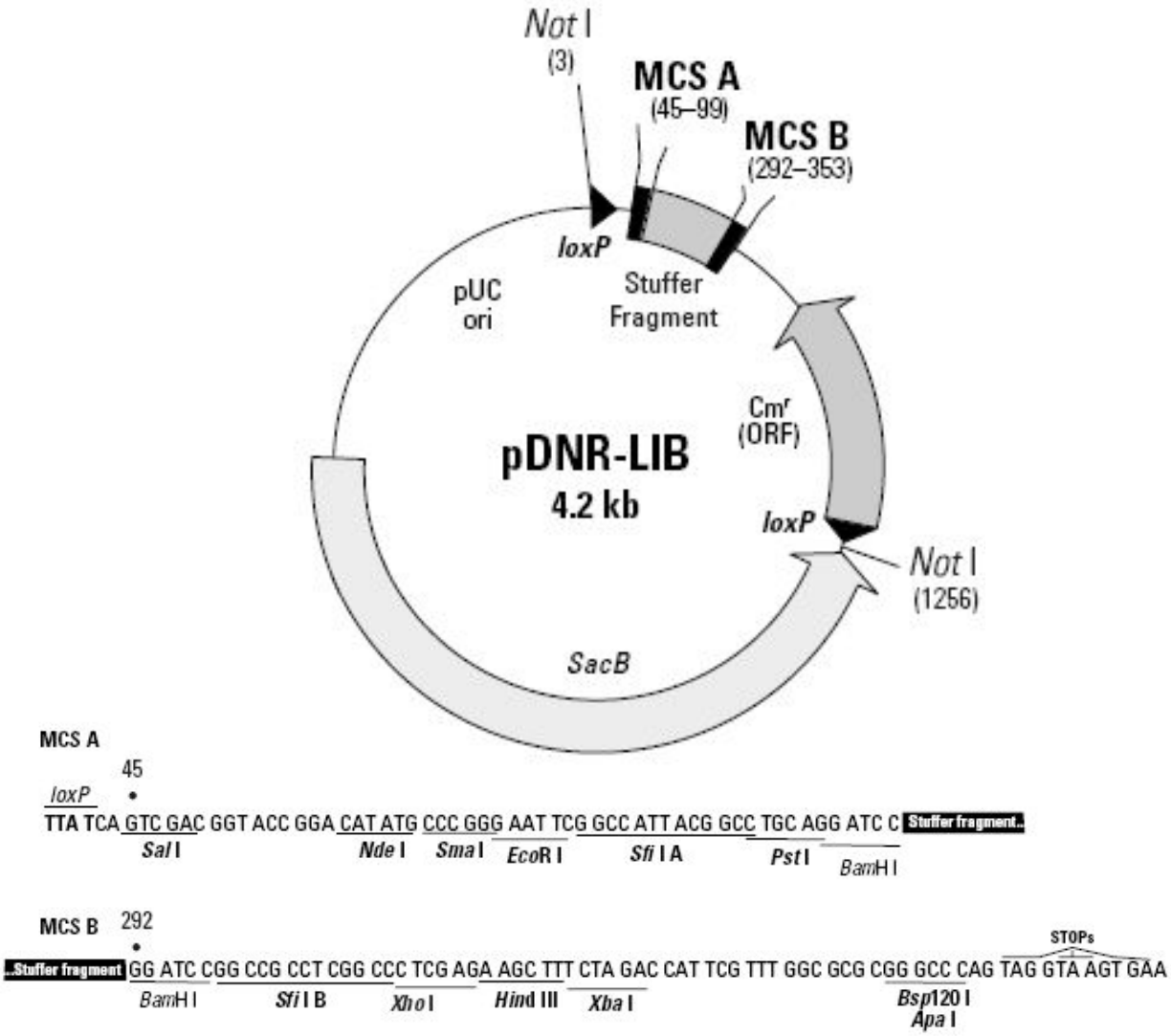
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA	Banco de amostras do LEEM/INPA

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

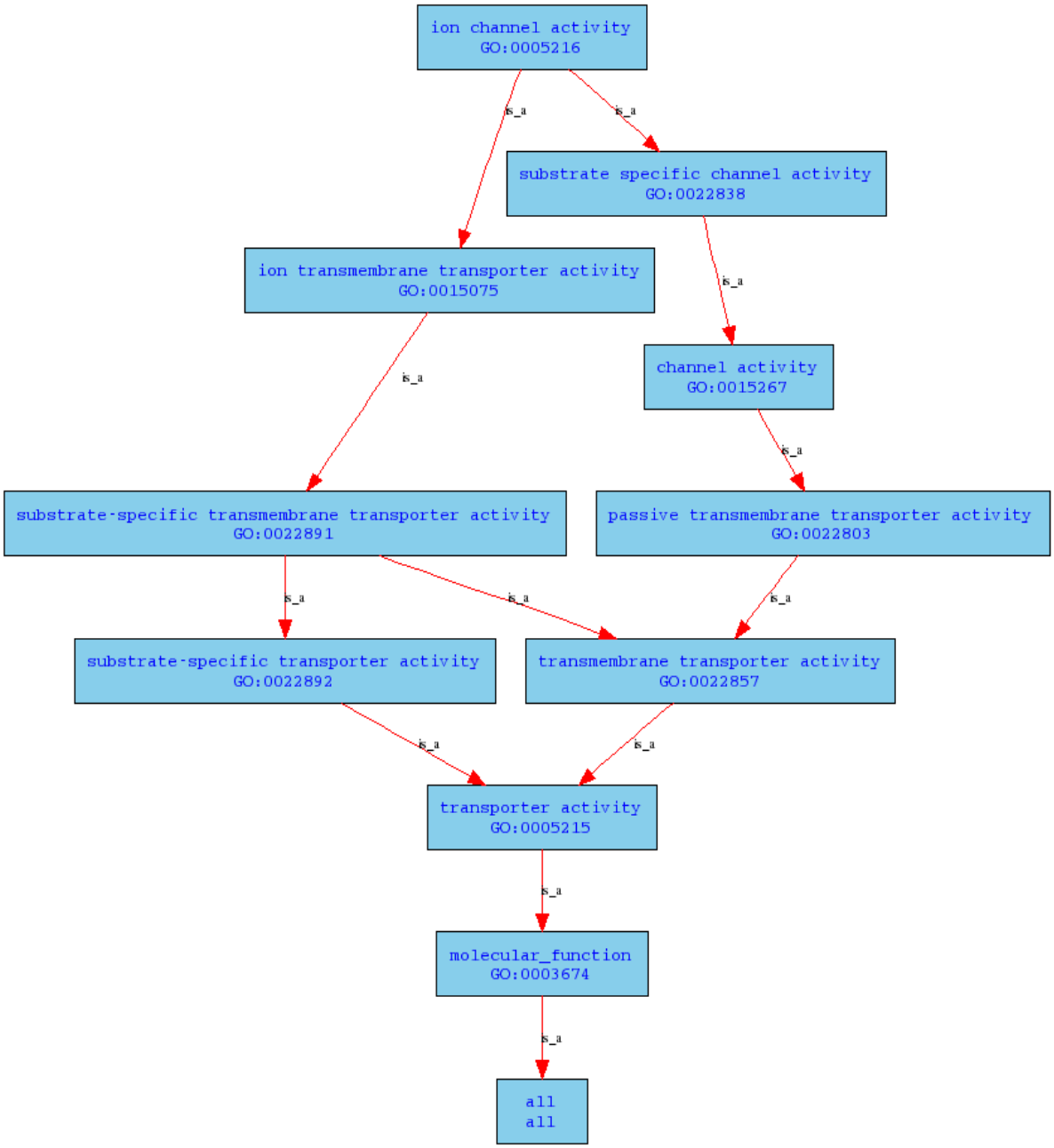
SISBIO

Código de autenticação: 66474961

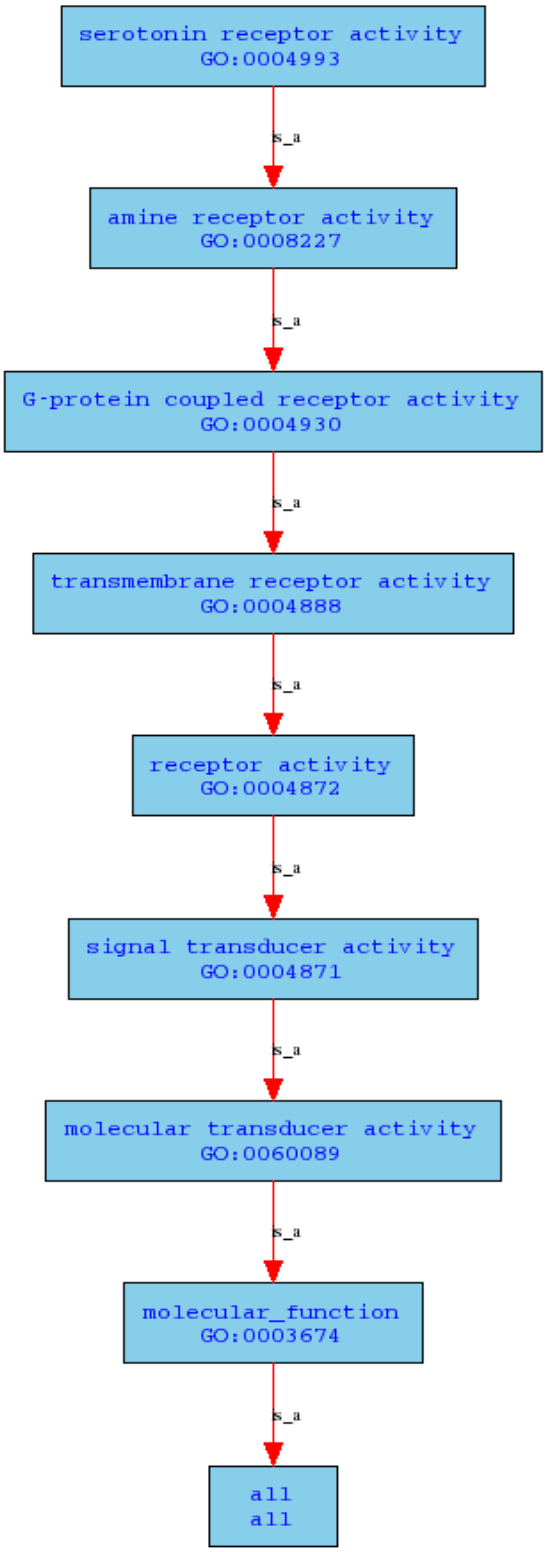
Anexo B. Mapa do vetor pDNR-LIB utilizado na construção das bibliotecas de cDNA de *Arapaima gigas*.



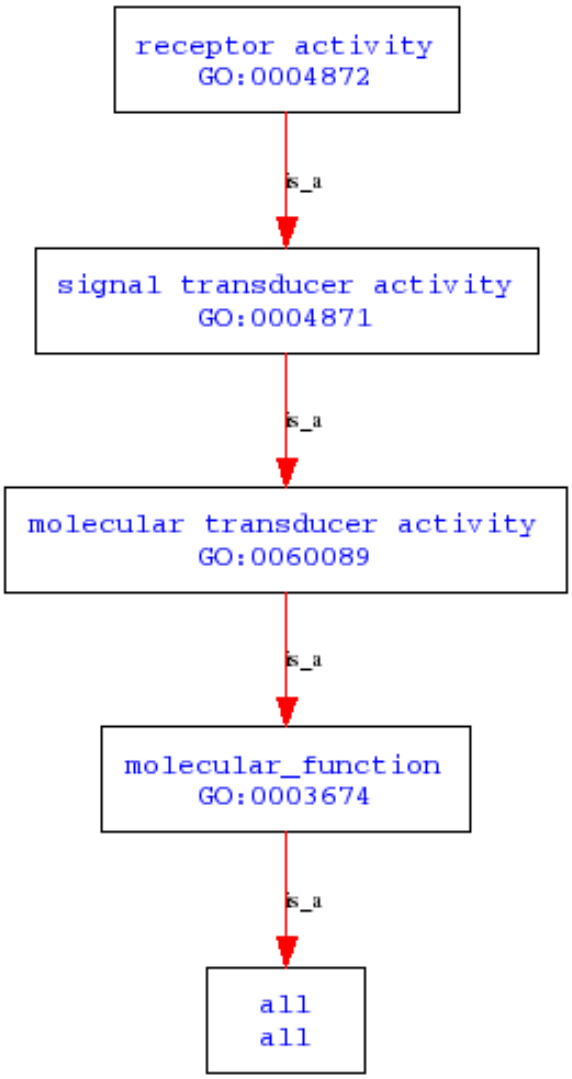
Anexo C. Processo biológico do gene Estrogen receptor, gerado pelo Gene Ontology.



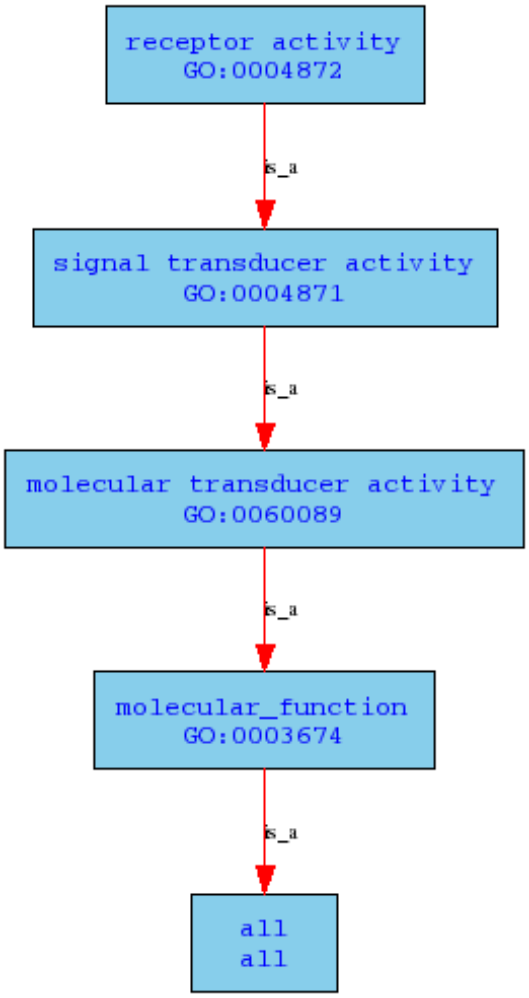
Anexo D. Processo biológico do gene Luteinizing hormone receptor, gerado pelo Gene Ontology.



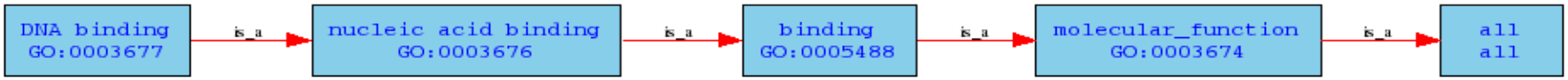
Anexo E. Processo biológico do gene Prolactin receptor, gerado pelo Gene Ontology.



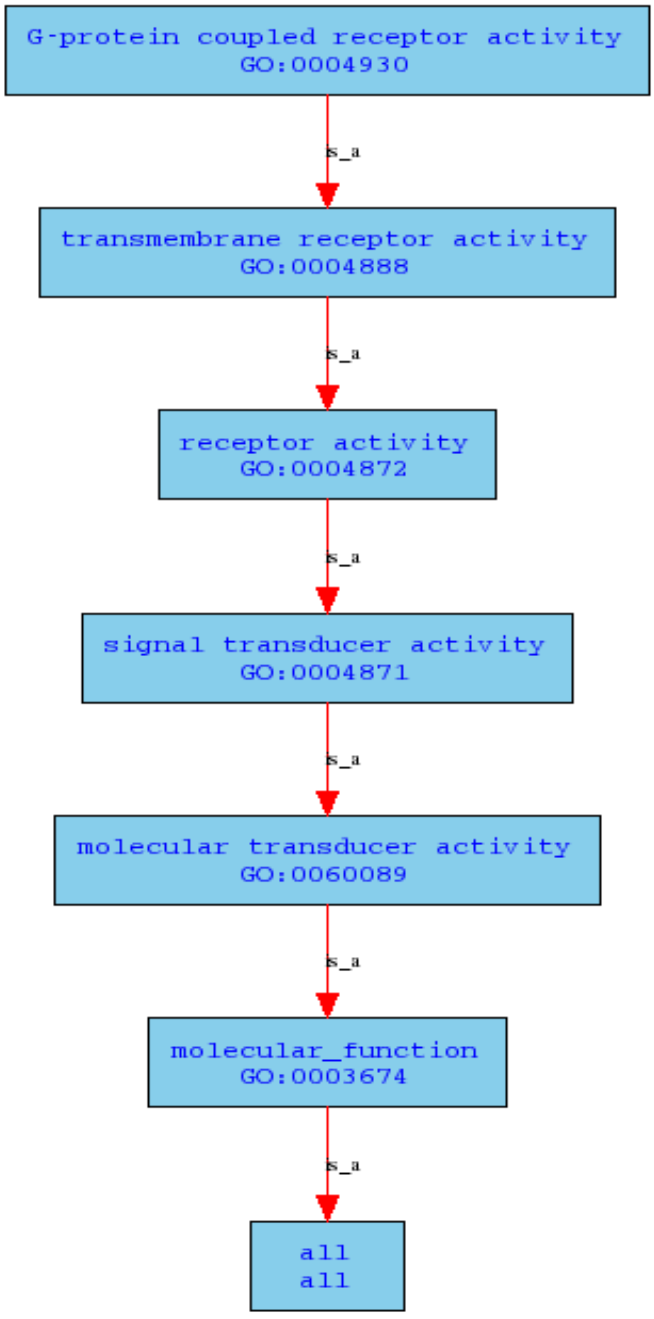
Anexo F. Processo biológico do gene Growth hormone receptor isoform 1, gerado pelo Gene Ontology.



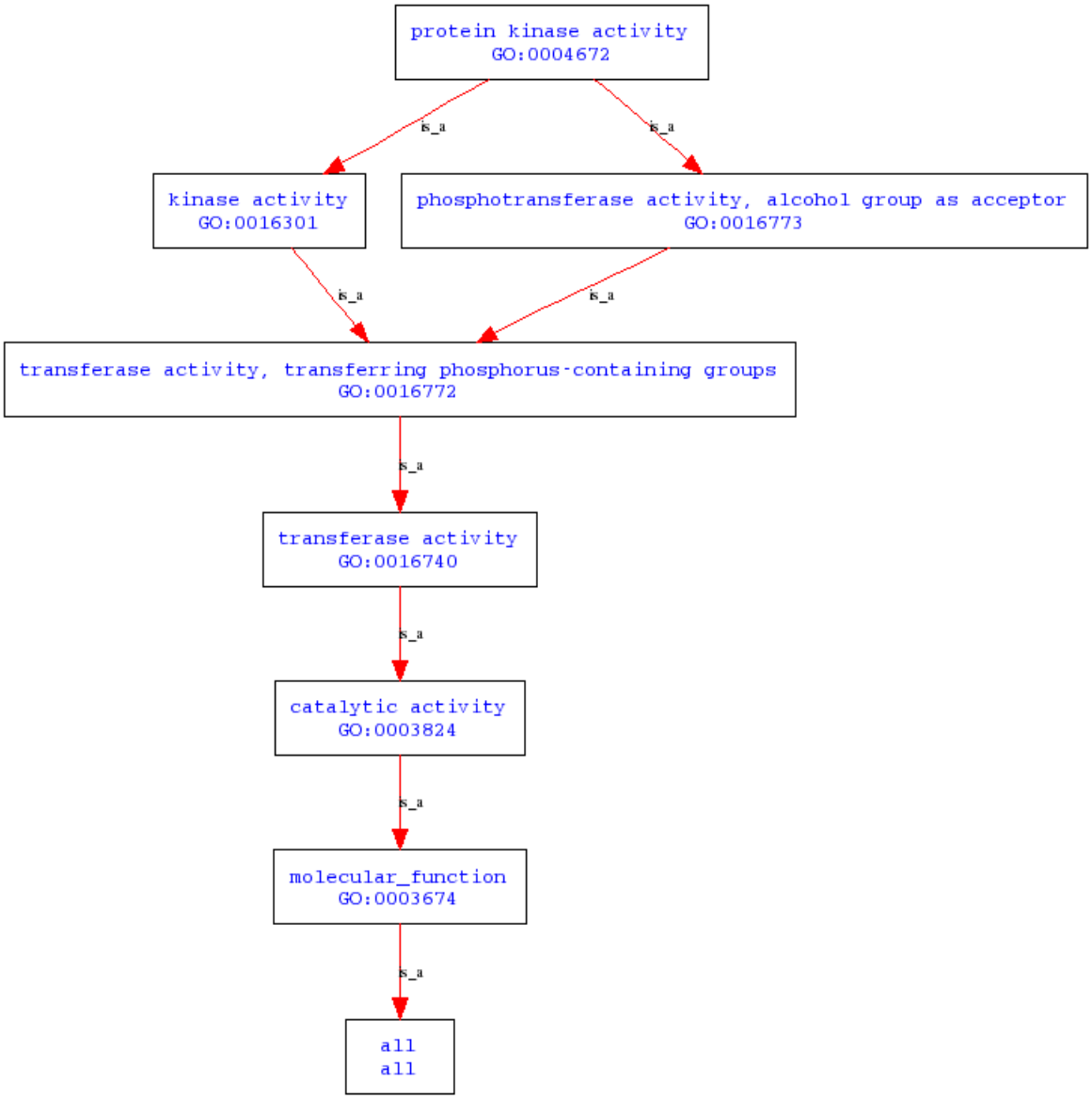
Anexo G. Processo biológico do gene Somatostatin receptor type 1 subtype A and B, gerado pelo Gene Ontology.



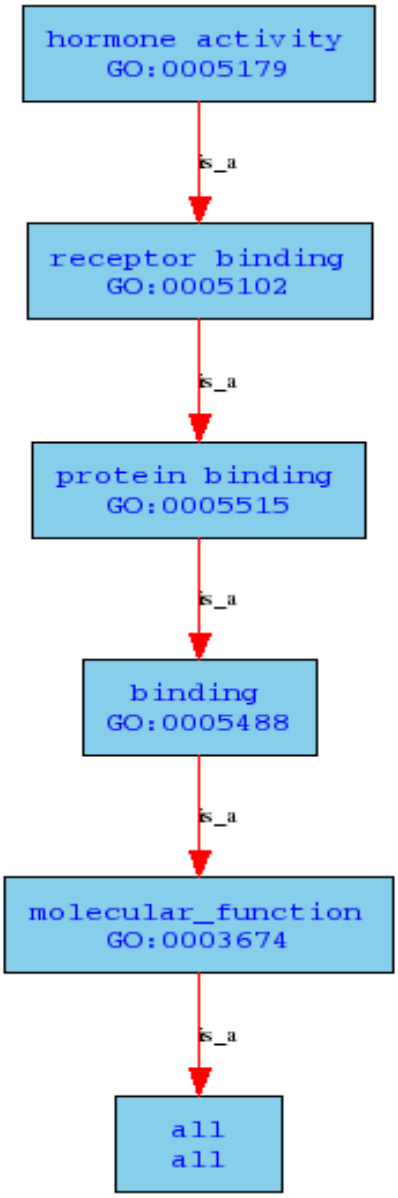
Anexo H. Processo biológico do gene Follistatin, gerado pelo Gene Ontology.



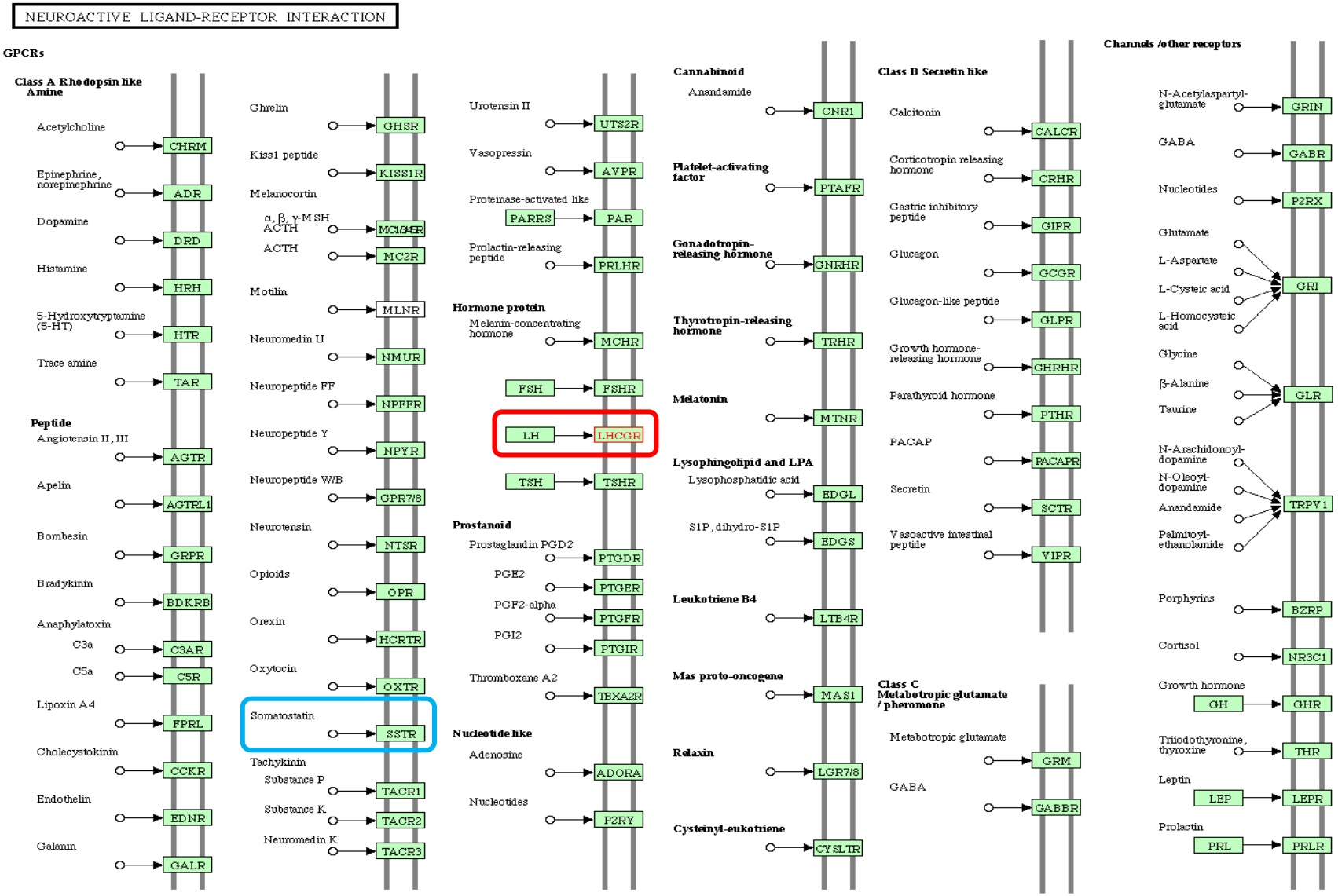
Anexo I. Processo biológico do gene Activin receptor IIB, gerado pelo Gene Ontology.



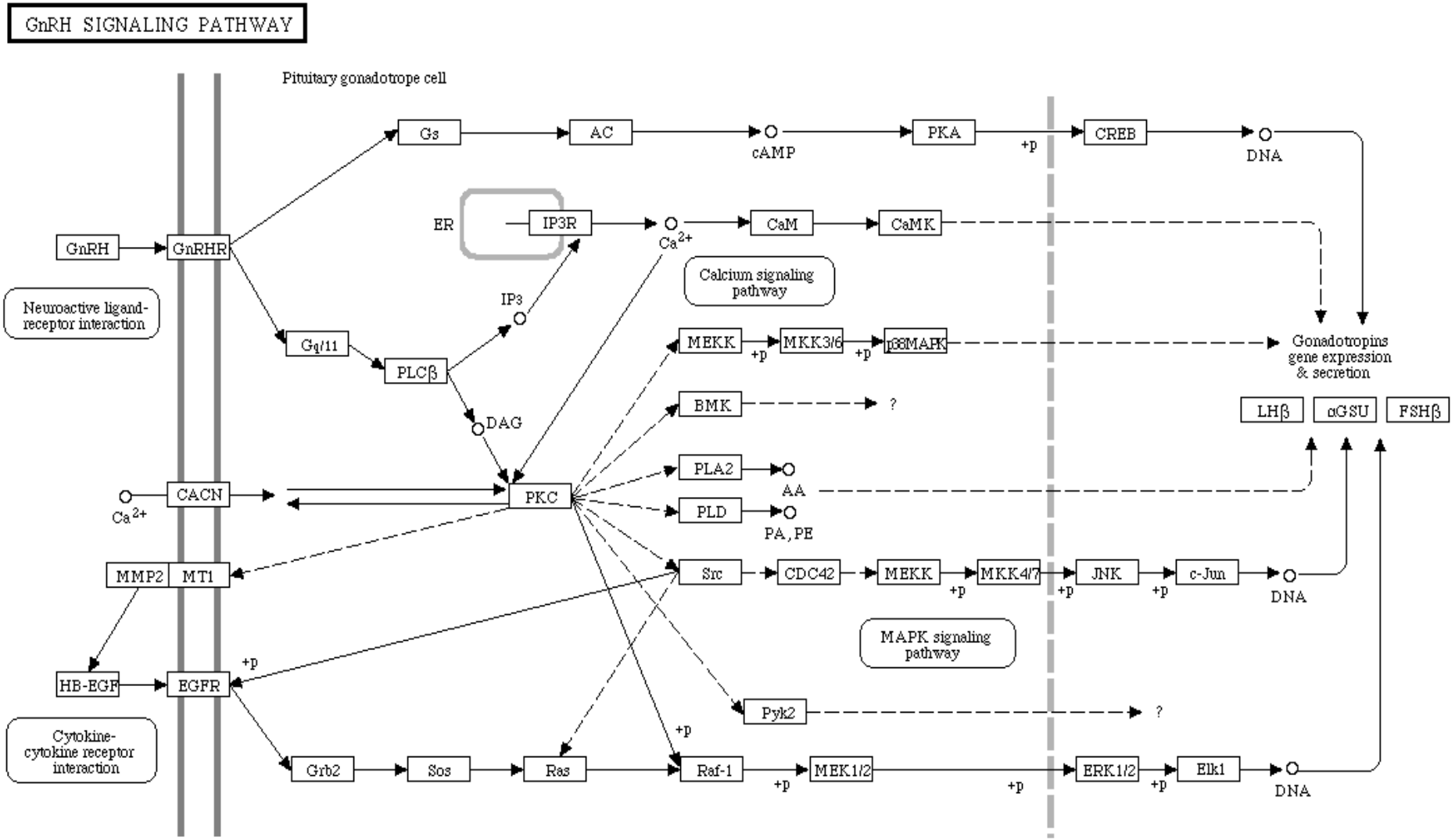
Anexo J. Processo biológico do gene Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, gerado pelo Gene Ontology.



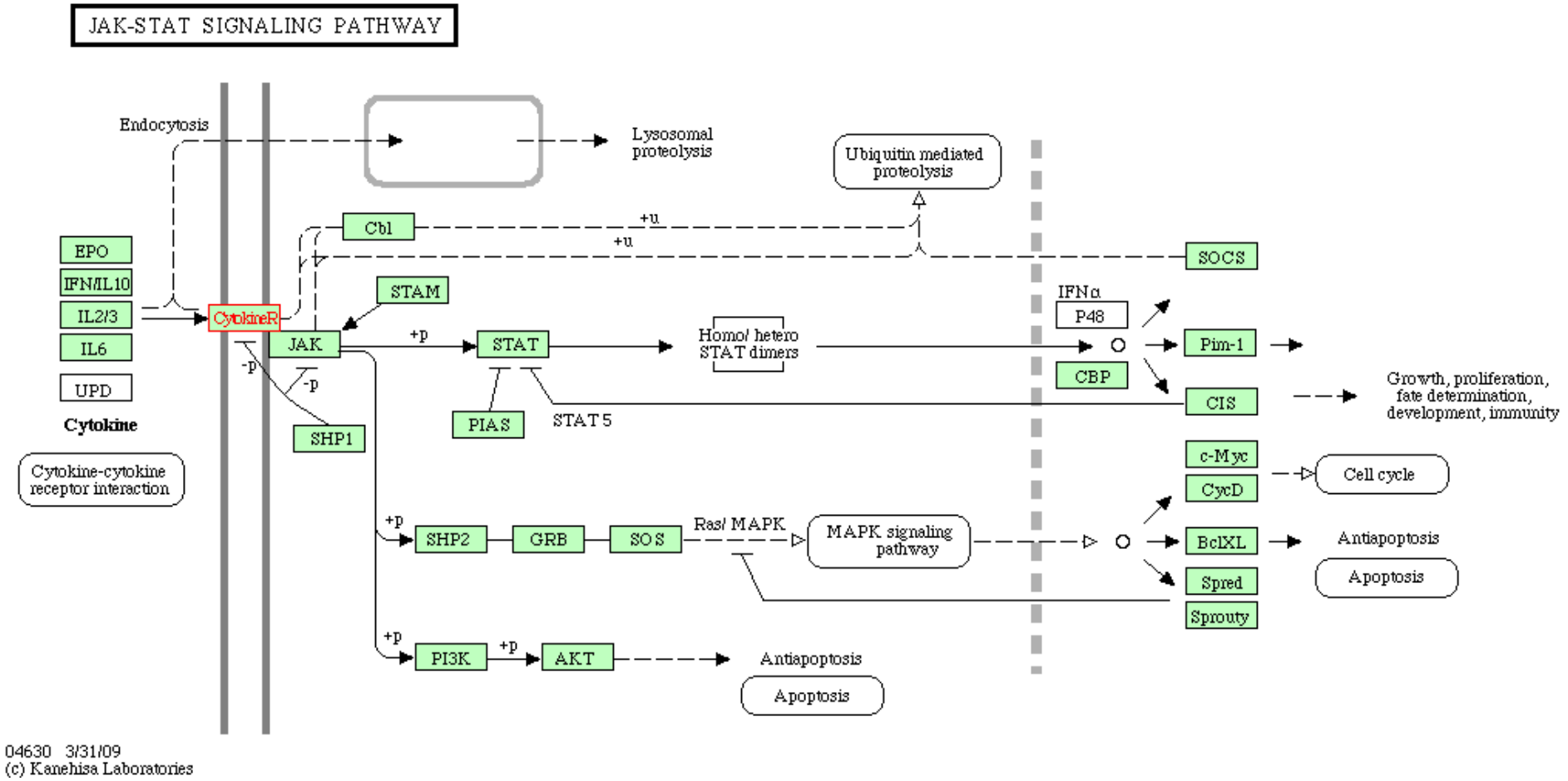
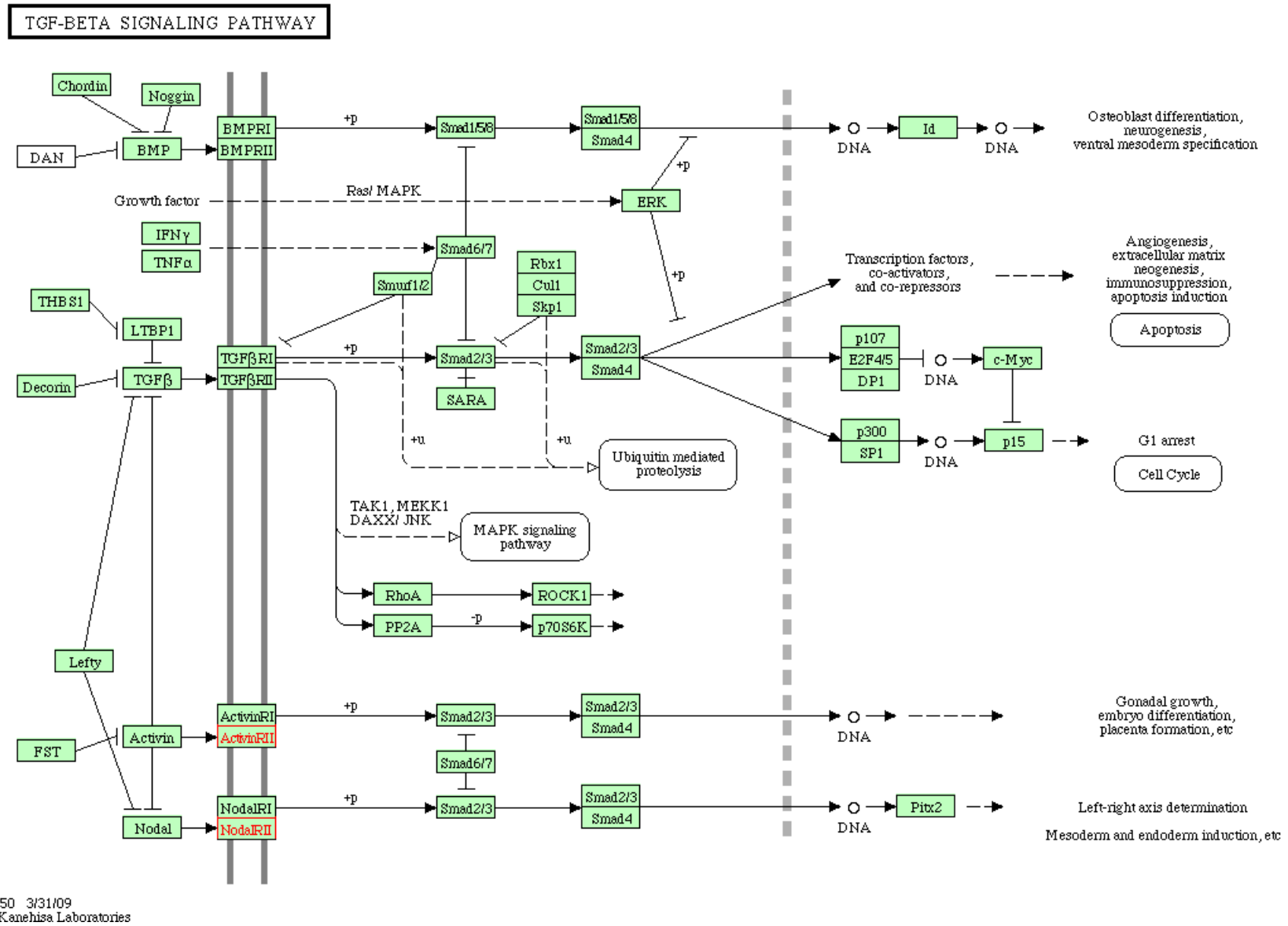
Anexo L. Mapa metabólico do gene Receptor de somatostatina (em azul) e do Receptor do hormônio luteinizante (em vermelho). Fonte: www.genome.jp/kegg



Anexo M. Mapa metabólico do gene Receptor do hormônio de crescimento. Fonte: www.genome.jp/kegg



ANEXO N. Mapa metabólico do gene Receptor de prolactina (em vermelho). Fonte: www.genome.jp/kegg



Anexo O. Mapa metabólico do gene Receptor de ativina IIB. Fonte: www.genome.