

OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) DO CICLÍDEO *Symphysodon discus* (HECKEL, 1840)

Josenilda Sales da COSTA¹; Ramon Barros BAPTISTA²; Vera Maria Fonseca de Almeida-VAL³; Maria de Nazaré Paula da SILVA⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Colaborador CBio /INPA; ³Coorientador CBio/INPA; ⁴Orientador CBio/INPA

1. Introdução

A bacia Amazônica sofre anualmente influências de diversos fatores ambientais, como as oscilações dos níveis dos seus rios, conhecidos como pulsos de inundações, que apresentam quatro períodos: enchente, cheia, vazante e seca (Sioli, 1990). No período de cheia, onde as áreas inundadas disponibilizam temporariamente novos ambientes aquáticos, existe uma reorganização na oferta de alimentos para as espécies de peixes que permanecem nos ambientes inundados. Com o surgimento desses novos ambientes, mudanças também são detectadas nas características físicas e químicas da água, como os níveis de oxigênio dissolvido, limitantes em diversos corpos d'água da Amazônia. As espécies que habitam estes ambientes inundados desenvolveram, ao longo de sua evolução, uma série de ajustes morfológicos, fisiológicos, metabólicos e moleculares para suportar estas condições hipóxicas. Uma das espécies endêmicas da bacia amazônica que apresenta elevada tolerância à hipoxia é o ciclídeo *Symphysodon discus*, ou acará-disco, que habita ambientes de várzea e igapós para fins alimentares e reprodutivos, experimentando condições de baixo oxigênio na água. A adaptação de diversas espécies de peixes a condições hipóxicas, segundo trabalhos recentes (revisado por Nikinmaa & Rees, 2005), depende diretamente da regulação da expressão de genes importantes às suas especificidades fisiológicas. Um dos genes importantes na resposta às condições de hipoxia é o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), considerado o principal regulador da angiogênese (Connolly *et al*, 1989), atuando na proliferação e desenvolvimento de células endoteliais, melhorando a vascularização dos tecidos (Connolly, 1991). Até o momento, sequências gênicas de peixes da Amazônia têm sido pouco exploradas e ainda são escassas em bancos de dados genômicos. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi obter sequências parciais do gene VEGF em adultos de acará disco *Symphysodon discus* e validá-las em bancos de dados genômicos, embasando trabalhos futuros no âmbito genômico e fisiológico desta espécie.

2. Material e Métodos

Foram coletados quatorze indivíduos adultos de *Symphysodon discus*, na localidade do rio Cuieiras/AM. Os mesmos foram expostos a hipoxia aguda por três horas e amostras musculares foram coletadas, colocadas em um microtubo, armazenadas em nitrogênio líquido e transportado para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM). No Laboratório foi realizada a extração do RNA Total das amostras de músculo do *Symphysodon discus*, com o *TRIzol® Reagent* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração de RNA, foi realizada uma síntese de cDNA por tratamento enzimático com transcriptase reversa (MMLV Reverse Transcriptase) (Invitrogen®), onde foi sintetizada uma fita de DNA a partir de uma molécula de RNA. Com a fita de cDNA sintetizada, realizou-se uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes de interesse (VEGF, 28S e 18S) por meio de um termociclador *Eppendorf* Mastercycle Gradient. Após a PCR foi realizada a purificação dos produtos de interesse amplificados, visando para remoção dos reagentes da PCR. Finalmente as amostras purificadas foram sequenciadas num sequenciador automático *ABI 3130 Sequence Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram submetidas ao programa Blast para a confirmação do gene por busca de homologia com outras espécies do banco de dados e finalmente alinhadas e editadas por meio do software BioEdit para obtenção de uma sequência única referente ao gene de interesse.

3. Resultados e discussão

O RNA total extraído das amostras do músculo branco da espécie *Symphysodon discus* foi analisado em gel de agarose 1%, como pode ser observado na figura 1, as bandas de RNA ribossomal (28S, 18S e 5,8S), indicadas no gel, revelam a boa qualidade e integridade do RNA total extraído. As concentrações obtidas estiveram entre 170 e 250 ng/ μ L.

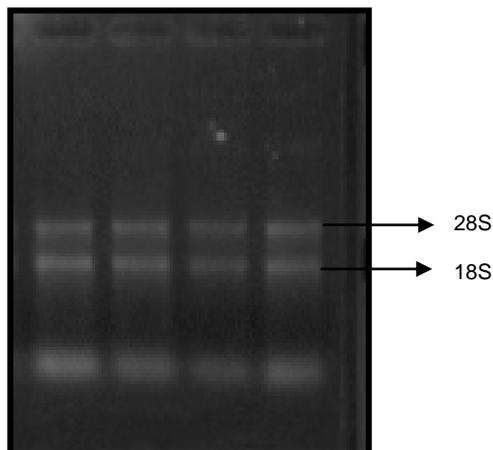


Figura 1 - Gel de agarose 1% do produto de extração de RNA total de *symphysodon discus*

Com a boa qualidade da extração de RNA total, foi realizada a síntese de cDNA, a partir das moléculas de mRNA, utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Figura 2).

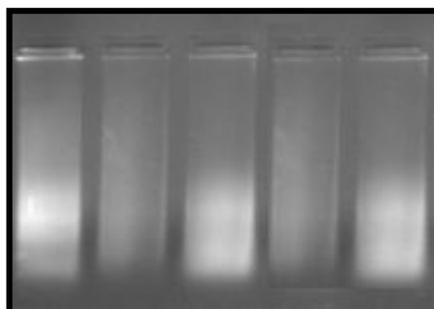


Figura 2 - Gel de agarose 1%, referente à síntese de cDNA, do gene VEGF da espécie de *symphysodon discus*.

Na figura 2 observa-se uma nuvem esbranquiçada (*smear*) de diferentes tamanhos de moléculas de cDNA, o que demonstra que os variados fragmentos de RNA mensageiro foram devidamente utilizados como molde para a síntese de cDNA pela enzima Transcriptase Reversa.

A adequada síntese de cDNA permitiu a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para as amplificações do gene VEGF, 28S e 18S, como pode ser observado na figura 3. Os genes ribossomais 28S e 18S foram utilizados como controles endógenos. Essas amplificações revelam o correto anelamento dos primers utilizados nas temperaturas específicas testadas. Apesar disto, o correto anelamento na região do gene de interesse só pôde ser confirmada após o sequenciamento.

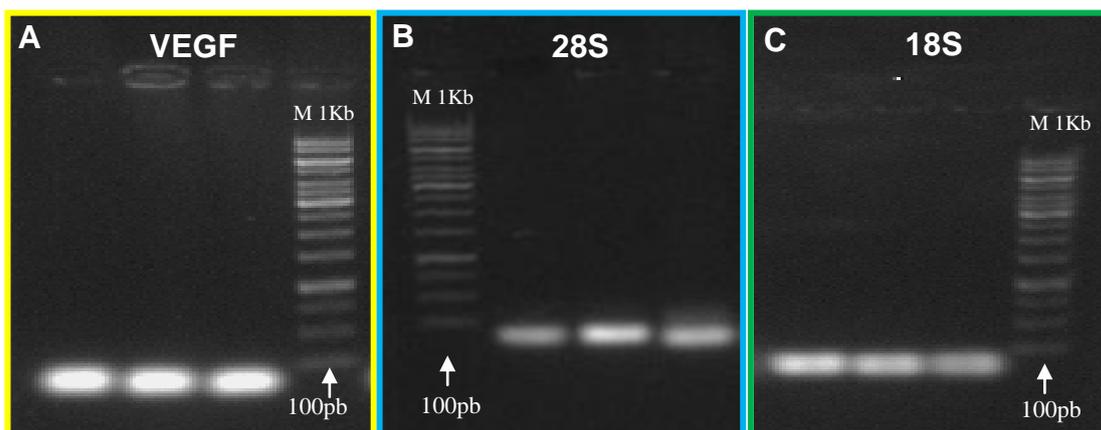


Figura 3 - Produtos de PCR amplificados referentes aos genes VEGF (A), 28S (B) e 18S (C), em gel de agarose 1%.

O sequenciamento das amostras amplificadas, confirmadas por meio do Blastn (NCBI) a similaridade com um peixe da America do Norte, *Osmerus mordax* (Mitchill, 1814), revelou o correto anelamento dos primers nas regiões de interesse dos genes. As seqüências dos genes VEGF, 18S e 28S estão apresentadas na tabela à seguir.

Tabela 1 - Sequências dos nucleotídeos dos genes sequenciados da espécie de *symphysodon discus*.

GENES	SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS
18S (162) pb	5' AGTCGTGGGGTTGGAGAGATCAGATACCGTCGTAGTTCCGACCATAAACGATGCCAACT AGCGATCCGGCGGCCTTATTTCCCATGACCCGCCGGGCAGCGTCCGGGAAACCAAAGTCTTT GGGTTCCGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGG3'
28S (286) pb	5' CGACGCGTTCGGAGCGCGGGGCGATGTCTTACGTCGCCCCCGGCCGATCGAAAGGGAGT CGGGCTCAAATCCCCGAACCTGGAGGTGTGGAGATAGGCGCCGCGAGGCGCCAGTGCGGC AACGCAAACGAACCCGGAAGCTGGCGGGGGCCCCGGGGAGAGTTCTCTTTTCTTTCTCC AGAGAGGGGGCGCCCTGGAATGGGTTTCGCCCCGAGATAGGGGGCCGCGCCCTGGAAAGCGTC GCGGTTCCGGCGGCCTCCGGTGAGCTCTCGAGGGCCCTTGAAA3'
VEGF (112) pb	5' ATGTTTGTGAGCCGTGTTGCGATCAGTGCTCAGAGATGAGTCAGCGTTTGTGGTACCG GCTGCTGCTGCCTGCCGGTGCTCCTGCAAACACACGGACGAATACTGTAAAGA3'

4. Conclusão

As técnicas aplicadas no processo de obtenção das seqüências dos genes desejados foram satisfatórias e possibilitaram o conhecimento de trechos dos genes VEGF, 18S e 28S da espécie *Symphysodon discus*. Estes fragmentos gênicos podem agora ser aplicados em diferentes vertentes de estudos genômicos, como a análise da expressão destes genes e estudos filogenéticos comparando a estrutura de genes de outros organismos. Tais estudos podem colaborar para um melhor conhecimento das respostas biológicas dos organismos da Amazônia sob o ponto de vista ecológico e evolutivo.

5. Referências

Connolly, D.T; Olander, J.V; Heuvelman, D; Nelson, R; Monsell, R; Siegel, N; Haymore, B.L; Leimgruber, R; Feder, J. 1989. *Human vascular permeability factor: isolation from U937 cells. J Biol Chem.* 264:20017-20024.

Connolly, D.T. 1991. *Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. J Cell Biochem.*47:219-223.

Nikinmaa M, Rees BB. 2005. *Oxygen-dependent gene expression in fishes.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 288:R1079-90.

Sioli, H. 1990. *Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais.* Editora Vozes, Petrópolis, RJ, Brasil. 73 pp.

Suporte: INCT – ADAPTA, CNPQ, FAPEAM, LEEM - INPA