

## PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EXPOSTO ÀS MUDANÇAS CLIMÁTICAS

Jéssica Rany da Silva LIMA<sup>1</sup>

Marcos Prado LIMA<sup>2</sup>

Adalberto Luis VAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista IC INPA - PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Colaborador;

<sup>3</sup>Orientador CBIO/INPA

### INTRODUÇÃO

O aumento na concentração de gases do efeito estufa (GEE), principalmente dióxido de carbono oriundo, sobretudo, de atividades antrópicas, tem contribuído para a elevação contínua da temperatura da Terra (revisado por Nascimento 2009). Devido à crescente exploração dos recursos naturais a Organização das Nações Unidas, por meio do Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima (IPCC 2007), projetou alterações no clima global baseadas em diferentes cenários previstos para 2100. Os resultados alertam para um aumento médio global das temperaturas entre 1,8 °C e 4,0 °C, dependendo das emissões de GEE, podendo caracterizar cenários brando (B1), intermediário (A1B) e extremo (A2). Dados recentes do IPCC (2014) mostram outros quatro cenários possíveis para o ano de 2100: o primeiro cenário prevê uma elevação da temperatura terrestre entre 0,3°C e 1,7°C, o segundo entre 1,1 °C e 2,6 °C, o terceiro entre 1,4 °C e 3,1 °C e o quarto e mais drástico entre 2,6°C e 4,8°C ao longo deste século.

Nas últimas décadas a Amazônia vem sofrendo com a crescente pressão antrópica decorrente do crescimento econômico, resultando no aumento do desmatamento e de incêndios florestais (Nobre *et al.* 2007). Apesar de abrigar a maior floresta tropical contínua do planeta, a Amazônia apresenta altas taxas de desmatamento que contribuem com a emissão de CO<sub>2</sub> (Marengo 2007) e representa cerca de 17% das emissões globais (IPCC 2007). O aumento das intervenções na Amazônia reflete imediatamente no ambiente aquático devido tanto a mudanças na dinâmica do sistema hidrológico quanto a mudanças pontuais que podem ter profundos efeitos sobre as comunidades de organismos aquáticos (Val 2011).

Os peixes podem responder de diversas formas para sobreviver a esse novo cenário ambiental (Oliveira 2003). Uma vez que os organismos respondem a diferentes estímulos ambientais por meio de alterações na expressão de seus genes que resultará na produção de novas proteínas, esse processo pode permitir a adaptação às condições adversas (Felix *et al.* 2002).

Em vista da crescente elevação na emissão de dióxido de carbono, e devido às incertezas que o aumento da temperatura pode causar sobre os organismos aquáticos, o presente estudo visa preparar amostras de DNA complementar (cDNA) de qualidade satisfatória, para posterior estudo de investigação de alterações no perfil de expressão gênica resultantes da exposição do tambaqui a diferentes cenários climáticos, previstos pelo IPCC para o ano de 2100, por meio de alterações no transcriptoma quando submetido aos cenários climáticos B1, A1B e A2, previstos pelo IPCC expressas aos 5, 15, 30 e 60 dias de exposição.

### MATERIAL E MÉTODOS

Após 30 dias de adaptação às condições de laboratório, os peixes foram divididos em quatro grupos com 30 peixes em cada grupo, sendo um grupo controle e três grupos experimentais. Em seguida, cada grupo foi dividido em seis aquários com aeradores, para facilitar a troca ar-água, e mantidos em microcosmos, que são um conjunto de quatro câmaras de 25 m<sup>3</sup> isoladas e integradas a um centro de controle automatizado, onde foram monitorados

continuamente os seguintes parâmetros: temperatura, concentração de CO<sub>2</sub> e oxigênio, fotoperíodo e umidade. Em cada câmara os valores de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> foram diferentes, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Cenários climáticos a que os exemplares de *Colossoma macropomum* foram submetidos, com indicação da temperatura e do nível de CO<sub>2</sub> em cada câmara.

Câmara	Cenário	Temperatura	Nível de CO <sub>2</sub>
Controle	Atual	Iguais aos valores de uma área florestal preservada	Iguais aos valores de uma área florestal preservada
Brando	B1	1,8°C acima da câmara controle	250 ppm acima da câmara controle
Intermediário	A1B	2,8°C acima da câmara controle	400 ppm acima da câmara controle
Extremo	A2	4,5°C acima da câmara controle	850 ppm acima da câmara controle

Decorrido cada tempo de exposição, um exemplar de cada aquário foi sacrificado, por meio de ruptura da coluna vertebral, para retirada de uma amostra de músculo branco, totalizando seis animais por câmara em cada tempo. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido e depois transferido para um freezer -80 °C.

A extração do RNA total foi realizada utilizando TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de tecido muscular foram homogeneizadas manualmente em microtubos de polipropileno utilizando um pistilo de plástico e 800µL de TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies). Após serem incubadas em gelo por 5 minutos, foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 200µL de clorofórmio sob agitação moderada por 15 segundos e incubado à temperatura ambiente durante 2 minutos. Após esse tempo, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante transparente contendo o RNA total foi transferido para um novo microtubo, seguido da adição de 500µL de álcool isopropílico (P.A.) gelado e incubado por 30 minutos em freezer -20 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g a 4 °C para a precipitação do RNA total. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e os *pellets* foram lavados com 500µL de etanol 75% e centrifugados a 7.500g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida todo o excesso de etanol foi descartado, o RNA foi desidratado à temperatura ambiente durante 10 minutos e os *pellets* de RNA total foram ressuspensos em 40µL de água ultrapura. A integridade do RNA extraído foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), com tampão TAE 1X, corado com GelRed TM (Biotium, Uniscience), e visualizado em transiluminador de luz UV. A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

A fim de remover possíveis resíduos de DNA genômico das amostras de RNA, as mesmas foram tratadas com o *kit DNase I* (Invitrogen, Life Technologies). Para cada 1µg de RNA total foi adicionado 1µL de tampão *DNase I* (10X), 1µL da enzima *DNase I* e água livre de nucleases em quantidade suficiente para

o volume final de 10µL. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente e a DNase I inativada adicionando 1µL de EDTA 25mM e incubadas por 10 minutos a 65 °C. A síntese de DNA complementar foi realizada seguindo as instruções do Kit Phusion RT-PCR (Thermo Scientific). Para tal, foram misturados em um microtubo de polipropileno: 500ng de RNA total livre de DNA genômico, 1µL do iniciador oligo (dT)<sup>18</sup> e água livre de nucleases em quantidade suficiente para o volume final de 12µL. Posteriormente os tubos foram incubados a 42 °C por 60 minutos e adicionados à reação 4µL de tampão (5X), 1µL do inibidor de RNases Ribolock (20 u/µL), 2µL de dNTP Mix (10 mM) e 1µL da enzima transcriptase reversa RevertAid™ H Minus M-MuLV (200 u/µL). A reação final foi realizada nas seguintes condições: 42 °C por 60 minutos e 70°C por 5 minutos em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). A confirmação da síntese de cDNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), com tampão TAE 1X, corado com GelRed™ (Biotium, Uniscience) e visualizado em transiluminador de luz UV. A quantificação das amostras de cDNA foi realizada por espectrofotometria utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de RNA com qualidade é processo fundamental para execução de análises da expressão gênica. Para obtenção de resultados confiáveis é importante que as sequências do RNA extraído estejam puras e íntegras. Sendo assim, 96 amostras de músculo branco de tambaqui apresentaram elevada concentração de RNA total (Tabela 2) e subunidades ribossomais (18S e 28S) bem definidas (Figura 1), indicando que as extrações apresentaram alta qualidade, o que é fundamental na etapa de conversão para DNA complementar (Trobe *et al.* 2010). A pureza das amostras de RNA, determinada pela absorbância 260/280 nm, variou entre 1,9 a 2,1, indicando baixa quantidade de contaminantes como proteínas ou compostos fenólicos.

Tabela 2. Média da quantificação de RNA total de *Colossoma macropomum* com indicação das concentrações mínimas e máximas.

	Cenário	Média [ ] µg/µL	Mínima [ ] µg/µL	Máxima [ ] µg/µL
5 dias	Atual	1765,9	1075,1	3170,9
	B1	1687,3	966,2	2687,3
	A1B	2505,6	1127,9	4261,3
	A2	2694,2	541,4	4394,4
15 dias	Atual	2720,5	2099,3	3371,5
	B1	3956,6	2450	5603,8
	A1B	4872,5	3494,1	7028,7
	A2	3419,5	3031,5	3997,4
30 dias	Atual	4242,1	3192,2	5204,8
	B1	3641,5	3223,7	4069,3
	A1B	3488,6	3161,3	3805,9
	A2	3114,3	2641,8	3822,7
60 dias	Atual	3061	2223,5	3795,6
	B1	2308,5	784,1	3723
	A1B	1800,6	1303	2236,7
	A2	1344,3	425,3	2237,1

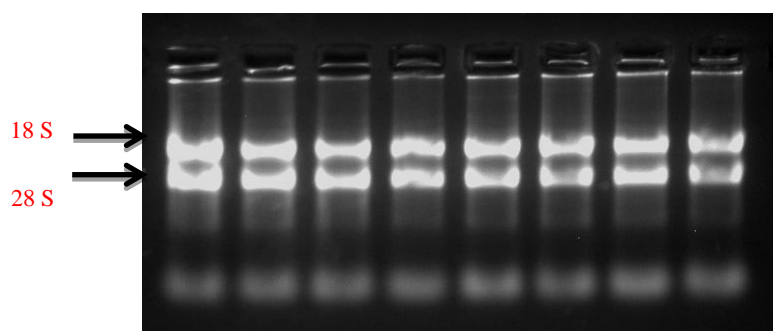


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), mostrando a integridade do RNA total extraído de oito amostras de tecido muscular branco de *Colossoma macropomum*. O mesmo procedimento foi realizado para as demais amostras.

O RNA total de 96 amostras foi tratado com a enzima DNase I e reversamente transcrito para DNA complementar, através do método da transcriptase reversa. Os resultados obtidos indicam que tanto a concentração (Tabela 3) quanto à integridade (Figura 2) das amostras estão satisfatórias para experimentos que utilizam a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), uma vez que as amostras de cDNA não devem conter fragmentos íntegros de RNA e estarem livres de contaminantes (Ginzinger 2002).

Tabela 3. Média da quantificação das amostras de cDNA de *Colossoma macropomum* com indicação de concentrações mínimas e máximas.

	Cenário	Média [ ] µg/µL	Mínima [ ] µg/µL	Máxima [ ] µg/µL
5 dias	Atual	1765,9	1075,1	3170,9
	B1	1687,3	966,2	2687,3
	A1B	2505,6	1127,9	4261,3
	A2	2694,2	541,4	4394,4
15 dias	Atual	2720,5	2099,3	3371,5
	B1	3956,6	2450	5603,8
	A1B	4872,5	3494,1	7028,7
	A2	3419,5	3031,5	3997,4
30 dias	Atual	4242,1	3192,2	5204,8
	B1	3641,5	3223,7	4069,3
	A1B	3488,6	3161,3	3805,9
	A2	3114,3	2641,8	3822,7
60 dias	Atual	3061	2223,5	3795,6
	B1	2308,5	784,1	3723
	A1B	1800,6	1303	2236,7
	A2	1344,3	425,3	2237,1

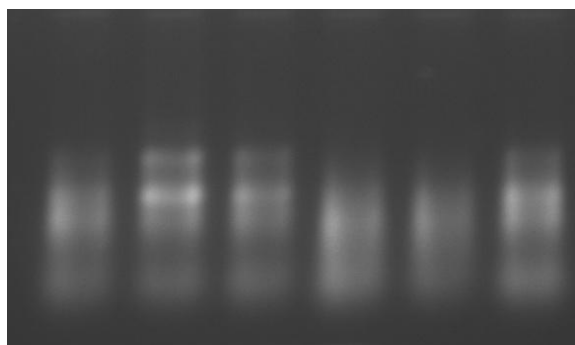


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), mostrando a integridade do cDNA de 6 amostras de tecido muscular branco de *Colossoma macropomum*. O mesmo procedimento foi realizado para as demais amostras.

Lamentavelmente, devido a atrasos nas análises de bioinformática que estavam sendo conduzidas por um colaborador externo, etapa fundamental para identificação de genes responsivos ao tratamento, não foi possível concluir a quantificação da expressão gênica por meio da técnica de qPCR, em tempo hábil até a conclusão das atividades do PIBIC. No entanto, essa etapa encontra-se ainda em andamento, com previsão de conclusão para os próximos meses.

## CONCLUSÃO

As amostras de RNA total e cDNA apresentaram padrão de qualidade e integridade satisfatórios para análise da expressão gênica por qPCR.

## REFERÊNCIAS

- Felix, J.M.; Drummond, R.D.; Nogueira, F.T.S.; Rosa-Junior, V.E.; Jorge, R.A.; Arruda, P. 2002. Genoma Funcional: uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 24: 60-67.
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
- IPCC Climate Change: summary for policymakers. 2007. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Marengo, J. 2007. *Caracterização do Clima Atual e Definição das Alterações Climáticas para o Território Brasileiro ao longo do Século XXI*, Distrito Federal, BR. 212 pp.
- Nascimento, A.G. 2009. ([www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/AGNascimento-200901-Resumo.pdf](http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/AGNascimento-200901-Resumo.pdf)). Acesso em: 22/01/2015.
- Nobre, C.A.; Sampaio, G.; Salazar, L. 2007. Mudanças climáticas e Amazônia. *Ciência e Cultura*, 59(3): 22-27.
- Oliveira, R.D. 2003. Efeitos da temperatura nas respostas cardio-respiratórias e na respiração aérea acessória de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Erythrinidae) aclimatados a 15, 20, 25 e 30°C e submetidos a variações de O<sub>2</sub> ambiental. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP. 76 pp.
- Trobe, C.; Waagbo, R.; Breck, O.; Olsvik, P.A. 2010. Optimisation of gene expression. Analysis in Atlantic salmon lenses by refining sampling strategy and tissue storage. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 1217-1225.
- Val, A.L. 2011. ([www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/PDFs/arq\\_549\\_76.pdf](http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/PDFs/arq_549_76.pdf)). Acesso em 22/01/2015.