

## OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RAG-2 EM APTERONOTIDAE.

Vanessa Susan da Silva PINHEIRO<sup>1</sup>; Diana José dos Santos FERREIRA<sup>2</sup>; Renata SCHMITT<sup>3</sup>; José Antônio ALVES-GOMES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora PCI/MCT/INPA; <sup>3</sup>Colaboradora MUSA; <sup>4</sup>Coordenador LFCE/CPBA/INPA

### 1. Introdução

Os peixes elétricos sul americanos, ordem Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysi), apresentam distribuição Neotropical e podem ser encontrados em praticamente todos os tipos de ambientes aquáticos, como por exemplo, no canal principal de grandes rios, pequenos tributários, lagos de várzea, igapós, lagos permanentes, lagos temporários, poças d'água, dentre outros (Alves-Gomes 1997). Com ocorrência registrada desde o sul do México até o norte da Argentina, é na bacia Amazônica que os Gymnotiformes apresentam a maior diversidade de espécies e abundância de indivíduos (Albert e Campos-da-Paz 1998) e segundo Santana (2007) a família Aptereronotidae é a mais especiosa, com cerca de 33% do número de espécies.

A família Aptereronotidae é conhecida popularmente como peixes fantasmas, sarapós ou ituíis e está composta de 61 espécies divididas em 14 gêneros (Mago-Leccia 1994; Reis *et al.* 2003; Santana 2007). São reconhecidos entre os Gymnotiformes pela presença de uma nadadeira caudal, um filamento dorsal eletroreceptivo e órgãos elétricos neurogênicos. Ocorrem da bacia do rio Tuyra no Panamá, até a bacia de La Plata na Argentina, sendo a maior diversidade, em nível de espécies, encontrada na calha da bacia do rio Amazonas e do rio Orinoco na Venezuela (Marrero e Taphorn 1991).

A característica marcante dos Gymnotiformes é a capacidade de produzirem e detectarem descargas elétricas de fraca intensidade na água pela ação do Sistema Eletrogênico e Eletrosensório (SEE) (Alves-Gomes 1995). Este sistema permite aos Gymnotiformes extraírem do ambiente as informações para sua navegação, alimentação, abrigo, além de viabilizar a comunicação inter e intra-específica em disputas hierárquicas, na defesa de território, no estabelecimento de parcerias reprodutivas e no estímulo à desova (Bullock *et al.* 1979; Hopkins e Heiligenberg 1978). Diante dessas características do SEE, estudos vêm sendo realizados para validar espécies de peixes elétricos como um eficiente e barato modelo para um sistema de monitoramento da qualidade da água em tempo real (exemplos: Alves-Gomes *et al.* 2004; Rossoni 2005; Ferreira 2006; Nogueira 2006). Embora estudos quanto à utilização destes peixes como biomonitores (Pimentel-Souza e Siqueira 1992; Thomas *et al.* 1997; Thomas *et al.* 1998) esteja em um grau avançado, a biologia básica dos Gymnotiformes no que diz respeito ao número de espécies válidas, ao seu relacionamento, a sua posição taxonômica e quanto ao número de famílias válidas para a ordem é ainda controversa.

Hoje, com o desenvolvimento de técnicas moleculares e de marcadores genéticos, é possível obter informações fundamentais, muito mais facilmente, sobre a biologia evolutiva dos grupos, incluindo a sistemática, a estrutura genética populacional e a diversidade das espécies de organismos. Diante disso, foi realizada a otimização de amplificação do gene nuclear Rag-2 em apteronotídeos para seja possível desencadear projetos que apresentem bases científicas sólidas para definir não só as melhores espécies indicadoras, como também para a melhoria do conhecimento taxonômico do grupo, associando o DNA barcode e a sistemática molecular das espécies.

### 2. Material e Métodos

#### Amostras

Por meio de um levantamento dos espécimes de apteronotídeos disponíveis no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) foram selecionados 90 indivíduos provenientes de coletas realizadas ao longo dos rios: Negro, Solimões e Branco (RR) desde o ano de 1993 até 2009. Foram coletados 57 indivíduos no ano corrente em ambientes localizados nas reservas Mamirauá e

Amanã – Tefé (AM) (exemplos: margem do rio Japurá, lago Amanã, lago Urini, ilha Ubim, Igarapé Açu, praia Caburini, Igarapé Repartimento e lago Mamirauá).

#### **Extração de DNA**

As extrações foram realizadas segundo o protocolo de isolamento de DNA total (modificado de Sambrook *et al*, 1989) que consiste na lise celular alcalina de aproximadamente 500 µg de tecido muscular com o auxílio de 1% de SDS e digestão com 20 µL de Proteinase K (20 mg.mL<sup>-1</sup>) na temperatura de 65 °C por uma hora com agitação constante. O produto da digestão foi então purificado (separado dos “debris” celulares) por sucessivas lavagens utilizando-se fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Depois de isolado, o DNA total foi precipitado com etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70% e eluído em tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,5 e EDTA 0,1 mM). O DNA extraído foi submetido a uma eletroforese em gel agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (EtBr – 0,5 µg/mL) para a verificação quanto ao grau de integridade deste DNA e também para sua quantificação, a qual foi realizada no próprio gel de agarose por comparação com marcador comercial de peso molecular conhecido, previamente aplicado no gel simultaneamente ao carregamento das amostras. As amostras que não apresentaram resultados positivos foram re-extraídas.

#### **Amplificação dos fragmentos de DNA**

As amplificações da região de interesse foram realizadas por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), onde o DNA total juntamente com um conjunto de reagentes, incluindo *primers* (iniciadores de cadeia) específicos para cada fragmento, foram submetidos a ciclos de amplificação em um termociclador.

Nas amplificações do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) foram utilizadas 30ng de DNA total, ao qual foram adicionados 2,5 µL de Tampão 10X; 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (1 U.µL<sup>-1</sup>); 5µL de dNTP (1mM); 1µL de cada *primer* (5µM) e água mili-Q para completar o volume da reação (25 µL). Esta mistura de reagentes foi submetida a uma amplificação de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, seguida por anelamento a uma temperatura 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Os *primers* utilizados foram BOL-COIfishF1 (5' TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC 3') e BOL-COIfishR1 (5' ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA 3').

Nas amplificações do gene RAG-2 foram utilizadas 19,5ng de DNA total, ao qual foram adicionados 2,5 µL de Tampão 10X; 0,75 µL de Taq DNA Polimerase (1 U.µL<sup>-1</sup>); 12,5µL de dNTP (1mM); 2µL de cada *primer* (5µM) e água mili-Q para completar o volume da reação (25 µL). Esta mistura de reagentes foi submetida a uma amplificação de 39 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 segundos, seguida por anelamento a temperaturas 58-52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Os *primers* utilizados foram RAG2GyF(5'ACAGGCRTCTTTGGKRTT 3') e RAG2R6 (5' TGRTCCARGCAGAAGTACTTG 3').

A eficácia da amplificação foi averiguada em eletroforese padrão (70 V por 45 min.) em gel de agarose 1% corado com BrEt (0,5 µg/mL).

Os indivíduos amplificados com sucesso foram então purificados utilizando-se PEG 20% (NaCl 2,5M) e submetidos à uma reação de sequenciamento pelo método de Sanger *et al*. (1977). A eletroforese dos fragmentos sequenciados foi realizada no sequenciador automático ABI.

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas com o auxílio do programa BIOEDIT 6.0.7 (Hall, 1999) e posteriormente foram submetidas a análises filogenéticas de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV) no programa MEGA 4 (Tamura *et al*. 2007).

#### **4. Resultados e Discussão**

A partir do levantamento dos espécimes de apteronotídeos disponíveis no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) foi possível obter 50 espécies e 90 indivíduos que já estavam com DNA total extraído a partir da mesma técnica utilizada nesse trabalho. Para testar a viabilidade desses DNAs foi realizada a amplificação do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI). Os resultados nos mostraram que os DNAs encontravam-se concentrados ou degradados pelo tempo de extração. Portanto foi necessário diluir em 10, 15, 25, 50, 100 vezes de acordo com a concentração dos DNAs, e lavá-los para recuperá-los. Dos 90 foram recuperados 18 indivíduos.

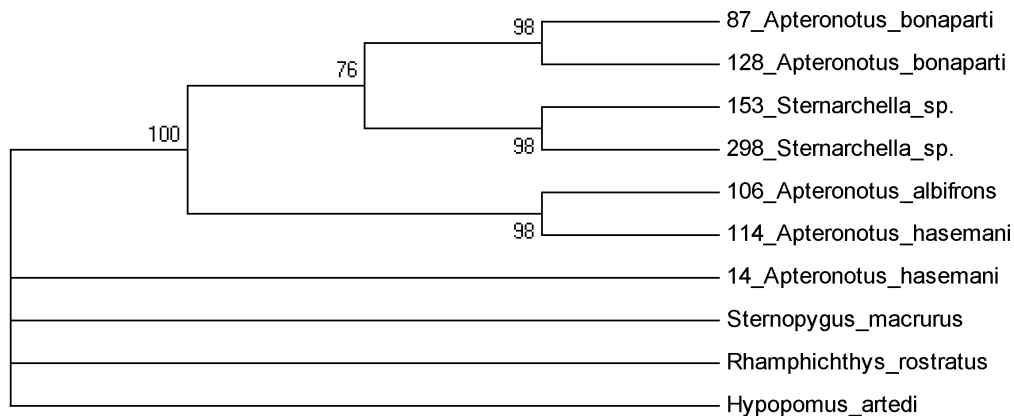
Das coletas realizadas aos redores das reservas Mamirauá e Amanã foi possível obter 14 espécies e 57 indivíduos. A extração de DNA resultou em bandas bem definidas.

Desses DNAs extraídos foi possível a amplificação do gene nuclear Rag-2 de 56 indivíduos. A Tabela 1 mostra a temperatura ideal de anelamento para amplificação de Rag-2 para as espécies utilizadas.

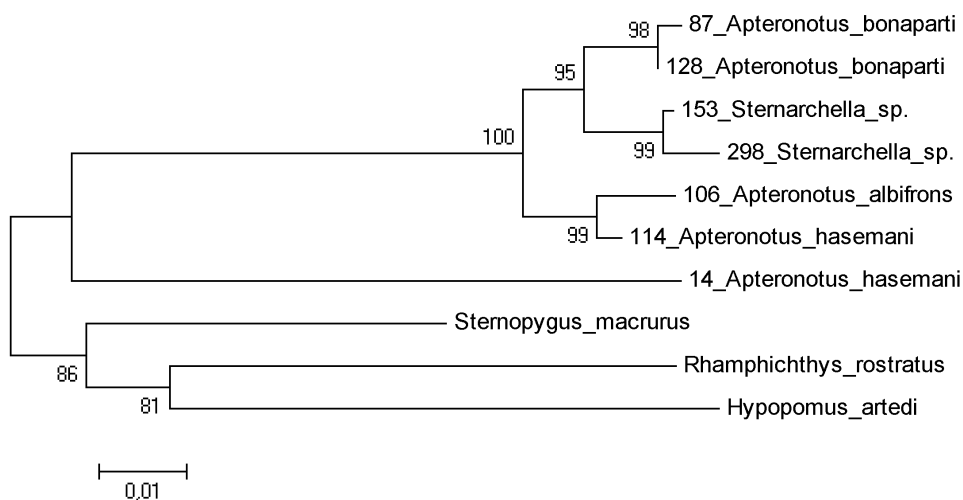
Foram obtidas 15 sequências utilizando o *primer forward* (RAG2GyF) e 29 sequências utilizando o *primer reverse* (RAG2R6). No entanto, somente para 7 indivíduos foram obtidas ambas as sequências, *forward* e *reverse*. As análises de MP (Figura 1) e MV (Figura 2) resultaram em topologias idênticas que mostram que as espécies foram recuperadas como grupos monofiléticos com exceção de *Apteronotus hasemani*.

**Tabela 1. Temperatura ideal de anelamento para amplificação de Rag-2 para algumas espécies da família Apterontidae.**

Espécies	Temperatura de anelamento (°C)
<i>Adonthosternnarchus balaneops</i>	55,3
<i>Apteronotus sp.</i>	53
<i>Apteronotus bonaparti</i>	53
<i>Apteronotus hasemani</i>	53
<i>Sternachella c. f. shotti</i>	53
<i>Sternachella sp.</i>	55,3
<i>Sternarchogiton nattereri</i>	55,3



**Figura 1. Topologia obtida a partir da análise de MP para o gene nuclear Rag-2. Os valores nos nós dos ramos representam os valores de *bootstrap* (> 50%) calculados a partir de 1000 réplicas.**



**Figura 2. Topologia obtida a partir da análise de MV para o gene nuclear Rag-2. Os valores nos nós dos ramos representam os valores de *bootstrap* (> 50%) calculados a partir de 500 réplicas.**

## 5. Conclusão

Para amplificação do gene nuclear Rag-2 em *Apteronotus sp.*, *Apteronotus bonapartii*, *Apteronotus hasemani* e *Sternachella c. f. shotti* a temperatura de anelamento ideal foi de 53°C. Já em *Adonthosternnarchus balaneops*, *Sternachella sp.* e *Sternarchogiton nattereri* a temperatura de anelamento foi de 55°C.

## 6. Referências

- Albert J. S. e Campos-da-Paz, R. 1998. Phylogenetic systematics of Gymnotiformes with diagnoses of 58 clades: a review of available data. In: Malabarba, L. R.; Reis, R.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S. e Lucena, C. A. S. (Eds.) *Phylogeny and Classifications of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS. p. 419-446.
- Alves-Gomes, J. A.; Rossoni, D. M.; Schwertner, G. 2004. Notas sobre o potencial utilização de peixes elétricos como bioindicadores de qualidade de água. In: *Bioindicadores de qualidade de água*. Embrapa meio Ambiente Jaguariúna-SP.
- Alves-Gomes, J. A. 1997. Informações preliminares sobre a bio-ecologia de peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes) em Roraima. In: Barbosa R. I.; Ferreira E. J. & Costellón E. G. (Eds.). *Homem, ambiente e Ecologia no Estado de Roraima*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM. p. 509-555.
- Alves-Gomes, J. A. 1995. *The phylogeny and Evolutionary history of the south american electric fishes (order Gymnotiformes)*. Tese de Doutorado, Universidade da Califórnia, San Diego, USA. 112pp.
- Bullock, T.H.; Fernandes-Souza, N.; Graf, W.; Helligenberg, W.; Langner, G.; Meyer, D.L.; Pimentel-Souza, F.; Scheich, H.; Viancour, T. A. 1979. Aspectos do uso da Descarga do Órgão Elétrico e eletrorrecepção nos Gymnotoidei e outros peixes Amazônicos. *Acta Amazonica*, 9(3): 549-572.
- Ferreira, D. J. S. 2006. *Efeito da temperatura sobre as Descargas dos Órgãos Elétricos de Apteronotus hasemani e Microsternarchus bilineatus (Pisces: Gymnotiformes)*, Amazonas, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 46pp.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windowa 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hopkins, C. D. e Helligenberg, W. F. 1978. Evolutionary designs for electric signals and electroreceptors in Gymnotoid fishes of Surinam. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 3:113-134.
- Mago-Leccia, F. 1994. *Electric fishes of continental water of continental waters of America*. FUDECI, 207 pp.
- Marrero, C. e Taphorn, D. 1991. Notas sobre la historia natural y la distribucion de los peces Gymnotiformes en la cuenca del rio Apure y otros rios de la Orinoquia. *Biollania*, (8): 123-142.
- Nogueira, A. P. R. 2006. *Estudo do comportamento do gênero Microsternarchus Fernández-Yépez, 1968 durante o período reprodutivo*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 75pp.
- Pimentel-Souza, F. e Siqueira, A. L. 1992. Effect of external carbon dioxide concentration on the electric organ discharge frequency in the gymnotiform fish *Apteronotus albifrons*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25(2): 175-180.
- Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. Jr. 2003. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre. 742 pp.
- Rossoni, D. M. 2005. *A utilização das descargas dos órgãos elétricos de Apteronotus hasemani e Apteronotus bonapartii (Apteronotidae – Gymnotiformes) como bioindicadores em ambientes aquáticos*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 99pp.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. In: *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 74: 5463-5467.
- Santana, C. D. C. M. 2007. *Sistemática e biogeografia da família Apteronotidae JORDAN 1900 (Otophysi: Gymnotiformes)*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 115pp.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.

Thomas, M.; Florion, A.; Chrétien, D. 1998. A new warning biomonitor using a weakly electric fish, *Apteronotus albifrons* (Gymnotiformes), and the effect of temperature on the bioelectric responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 51: 605 – 620.

Thomas, M.; Florion, A.; Chrétien, D. 1997. The effect of pH and conductivity on the electric behaviour of *Apteronotus albifrons* (Family Apterontidae) in a pollution monitoring system. *Environmental Technology*, 18: 1069 – 1083.