

ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE LDH EM PEIXES AMAZÔNICOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE REGIÕES CODIFICANTES E NÃO-CODIFICANTES DO LOCUS DE LDH-A EM PERCIFORMES.

Nayara Sousa Castro¹; Vera Maria Fonseca de Almeida e Val², Andréa Ghelfi³

¹Bolsista IC/CNPq/INPA; ²Orientadora LEEM /INPA; ³Co-orientadora ISB/UFAM

1. Introdução

A enzima Lactato Desidrogenase (LDH, EC: 1.1.1.27) é responsável pela manutenção do metabolismo glicolítico anaeróbico e do equilíbrio redox em vertebrados. Assim, a reação da LDH é essencial para o suprimento de NAD⁺ para um passo anterior da glicólise catalisado pela enzima gliceraldeído-fosfato desidrogenase, direcionando, dessa forma, a finalização aeróbica ou anaeróbica da via glicolítica, frente às necessidades metabólicas do tecido (Carvalho *et al.*, 1998) sendo considerada um bom indicador a estressores ambientais. Os estudos sobre a evolução dessa enzima em peixes têm ganhado notoriedade em função da sua relação com a evolução e o desenvolvimento de mecanismos adaptativos destes organismos, cujo grupo apresenta a maior radiação adaptativa dentre os vertebrados. A LDH possui diferentes isoenzimas que exibem propriedades diferentes e são distribuídas nos tecidos, de acordo com necessidades energéticas, disponibilidade de oxigênio, e funções fisiológicas (Almeida-Val *et al.*, 1995). Em vertebrados, a LDH apresenta três isoformas distintas, codificadas por seus respectivos genes *LDH-A*, *LDH-B* e *LDH-C*. Este estudo tem como objetivo a caracterização molecular de regiões codificadoras e não codificadoras dos genes da LDH-A a partir de sequências parciais e estabelecer uma relação filogenética com peixes amazônicos da ordem perciformes bem como analisar regiões amplificadas de todos os genes de LDH em diferentes espécies de peixes.

2. Material e Métodos

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de amostras de músculo branco de 23 espécies de peixes amazônicos das ordens Clupeiformes, Osteoglossiformes, Characiformes, Gimnotiformes, Siluriformes e Perciformes utilizando-se o protocolo de "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega Corporation). A avaliação da integridade do DNA genômico foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (0,5 µg/ mL) em solução tampão TAE 1X (Tampão Tris-Acetate - Tris 40mM, Acido Acético 20mM, EDTA 1mM) e visualização em luz UV.

A amplificação dos genes de LDH foi feita por reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando DNA de todas as espécies, com três pares de primers (forward e reverse) degenerados (LDH-A, LDH-B e LDH-C). Posteriormente, os fragmentos de interesse amplificados foram recortados e as amostras purificadas por meio do kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), que após quantificação, foram inseridas no Vetor *pGEM-T easy* seguindo protocolo de Sambrook, *et.al.* (2001) para transformação bacteriana, bem como para a extração do DNA plasmidial.

O sequenciamento dos fragmentos de interesse foi realizado em Sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems), utilizando-se o Kit Big Dye^R Terminator V3.1 Cycle Sequencing. As sequências obtidas foram comparadas no programa BLAST disponível no banco de dados NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>) e alinhadas no programa CLUSTALW, incorporado no diretório do editor de sequências BIOEDIT. Os parâmetros usados nos alinhamentos 0.2 e 10.0 para abertura e extensão de gaps nos alinhamentos múltiplos. As comparações par a par, informações estatísticas e as análises filogenéticas foram conduzidas pelo uso do programa PAUP v.4.010 e as inferências filogenéticas foram executadas usando o método da Parcimônia (Parsimony - P). Análises Bootstrap com 10.000 replicações foram executadas para acessar a robustez e a confiança da topologia obtida.

3. Resultados e discussão

As subunidades A e B da lactato desidrogenase exibem ampla distribuição nos tecidos, a subunidade C compõe isoenzimas que podem ser exclusivas a tecidos neurais, predominantemente no globo ocular (Rehse e Davidson, 1985; Coppes *et al.*, 1992), particularmente em grupos de teleosteos avançados. Contudo, segundo Tsuji *et al.* (1994), as isoenzimas de LDH foram identificadas pela primeira vez em um único loco com o LDH semelhante a do tipo A, sendo que este loco, no processo da evolução, foi duplicado para formar os locos de LDH-A e LDH-B, e o loco de LDH-B foi duplicado para formar os locos de LDH-B e LDH-C. Porém, um novo regime evolutivo foi proposto pela análise de seqüências de genes específicos em peixes sugerindo que LDH-C é o ancestral de ambos os locos de LDH-A e B.

Resultados eletroforéticos dos fragmentos do gene apresentaram amplificação de LDH-A para todas as espécies (Figura 1), LDH-B não amplificou em uma espécie de Siluriformes (Figura 2). E a LDH-C foi amplificada em uma espécie de Clupeiformes, três de Characiformes, quatro de Siluriformes e duas de Perciformes (Tabela 1) e apesar de ser amplificada em menor número de espécies, apareceu em algumas espécies anteriormente descritas como não detentoras deste gene como, por exemplo, as espécies de Characiformes e Siluriformes.

Além disso, foi possível fazer a caracterização molecular de peixes da ordem perciformes a partir de seqüências parciais em espécies congêneres, o que permitiu comparações de nucleotídeos e caracterização de regiões codificantes (exons) e não-codificantes (Introns) do locus *LDH-A*. Estudos sobre uma ampla variedade de táxons, incluindo peixes, têm demonstrado a importância do conhecimento dessas regiões (principalmente intrônicas), inclusive de outros genes, onde são encontrados elementos que podem estar envolvidos no regulamento ou silenciamento de transcrição (Wittekindt N.E *et al.*, 2000).

Comparando-se as seqüências da LDH-A de todas as espécies de perciformes, excluindo-se os íntrons, detectou-se uma região conservada com 33 nucleotídeos (Figura 4). As espécies *Cichla monoculus* e *Pachypops trifilis* compartilham 32 aminoácidos idênticos e suas seqüências revelam duas regiões intrônicas de alta similaridade, ambas com três éxons. *Plagioscion squamosissimus* possui dois íntrons (223 nucleotídeos). *Astronotus ocelattus* não apresenta íntrons, diferentemente de sua espécie congênere *Astronotus crassipinnis* para a qual 42 nucleotídeos podem ser identificados como uma região intrônica. Comparando-se as espécies de Cichidae (Tucunaré e Acará), foram detectadas oito regiões conservadas. Em *Pachypops trifilis* e *Plagioscion squamosissimus* análises sem íntrons revelam seis regiões conservadas. *P. squamosissimus* e *Astronotus ocelattus*, apesar de pertencerem a famílias diferentes, apresentam três regiões conservadas do gene. Na região codificadora, foram identificados 69 aminoácidos altamente conservados em todas as espécies em estudo (Figura 5).

O nível de conservação do gene entre as espécies era, de certa forma, esperado, visto que cada resíduo de seqüências de proteína tem um papel específico no funcionamento da molécula, da sua estabilidade interna e suas interações funcionais externas (Edmunds *et al.*, 2009).

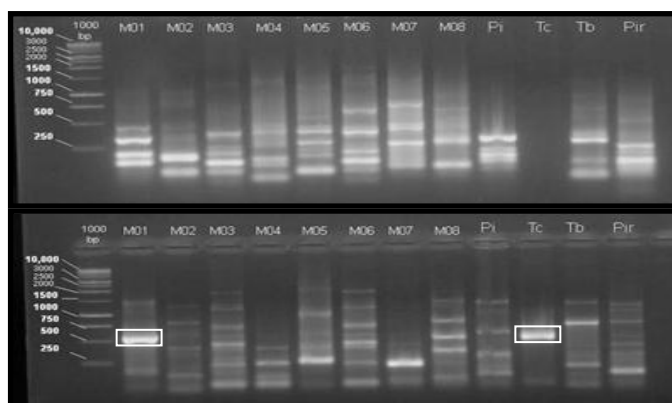


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5% - de PCR. Fileira de Cima: Primers LDH-A 1F, 1R. Baixo: Primers LDH-A 2F, 2R. M01: Pescada; M02: Acará-papa terra; M03: mapará; M04: Aracu; M05: reco-reco; M06: Mandi; M07: Sarapó; M08: Sardinha; Pi: Piranha; Tc: Tucunaré; Tb:Tambaqui; Pir: Pirarucu. Temperatura de anelamento: 50°C

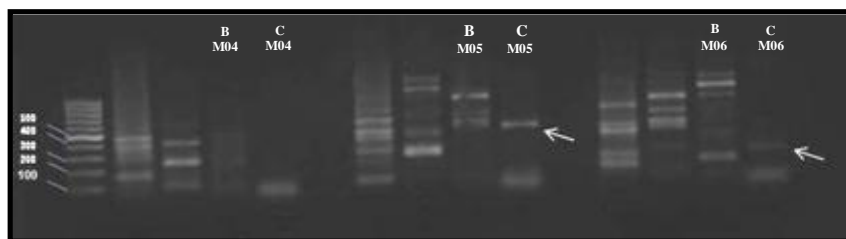


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1.5% - de PCR. Primers LDH-B e LDH-C. M04 e C M04: Aracu; B M05 e C M05: Reco-reco; B M06 e C M06: Mandi; Temperatura de anelamento: 48°C

Nº	Espécie	Nome Popular	Ordem	LDH-A	LDH-B	LDH-C
1	<i>Arapaima gigas</i>	Pirarucu	Osteoglossiformes	x	x	
2	<i>Pellona castelnaeana</i>	Apapá	Clupeiformes	x	x	x
3	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Characiformes	x	x	
4	<i>Pygocentrus nattereri</i>	Piranha-Caju	Characiformes	x	x	
5	<i>Laemolyta varia</i>	Aracu-caneta	Characiformes	x	x	
6	<i>Triportheus angulatus</i>	Sardinha	Characiformes	x	x	
7	<i>Mylossoma duriventris</i>	Pacu-Manteiga	Characiformes	x	x	
8	<i>Cynodon gibbus</i>	Peixe cachorro	Characiformes	x	x	x
9	<i>Potamorhina latior</i>	Branquinha-Comum	Characiformes	x	x	x
10	<i>Hemiodus immaculates</i>	Orana	Characiformes	x	x	
11	<i>Brycon amazonicus</i>	Matrinxã	Characiformes	x	x	
12	<i>Curimatella meyeri</i>	Curimatã	Characiformes	x	x	
13	<i>Eigenmannia virescens</i>	Sarapó	Gimnotiformes	x	x	
14	<i>Opsodoras ternetzi</i>	Reco-reco	Characiformes	x	x	x
15	<i>Liposarcus pardalis</i>	Bodó	Siluriformes	x	x	x
16	<i>Hypophthalmus fimbriatus</i>	Mapará	Siluriformes	x	x	x
17	<i>Pimelodus blochii</i>	Mandi	Siluriformes	x	x	x
18	<i>Ageneiosus SP</i>	Mandubé	Siluriformes	x		
19	<i>Pseudiplatystoma fasciatum</i>	Surubim	Siluriformes	x	x	x
20	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	Pescada	Perciformes	x	x	
21	<i>Pachypops trifilis</i>	Pescada	Perciformes	x	x	
22	<i>Geophagus proximus</i>	Acará-papa terra	Perciformes	x	x	x
23	<i>Cichla monoculus</i>	Tucunaré	Perciformes	x	x	x

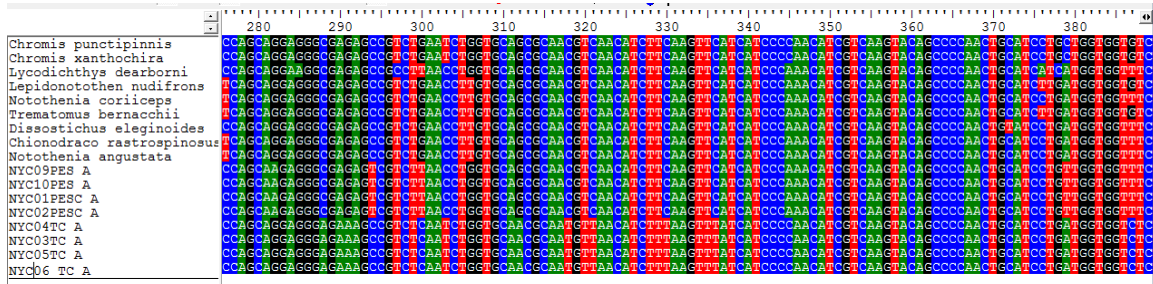


Figura 3. Alinhamento de seqüências de LDH-A pelo programa CLUSTALW e Bioedit. *Pachypops trifilis* – pescada, *Cichla monoculus* – tucunaré, e espécies que apresentaram similaridade do gene no Genbank. Mostrando regiões bem conservadas e similares entre as espécies de diferentes famílias da ordem Perciformes.

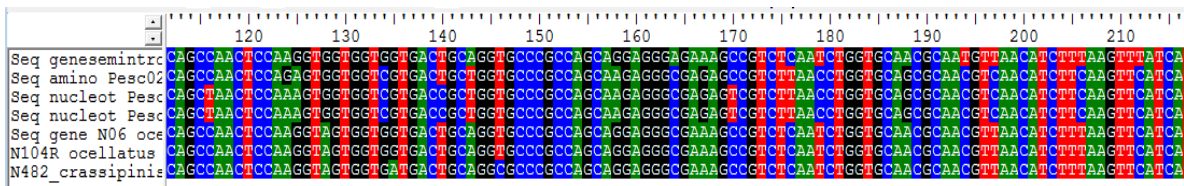


Figura 4. Alinhamento de seqüências de LDH-A pelo programa CLUSTALW e Bioedit. *Pachypops trifilis* – pescada, *Plagioscion squamosissimus* – Pescada, *Cichla monoculus* – tucunaré, *Astronotus ocellatus* – Acará, *Astronotus crassipinnis* – Acará. Regiões conservadas e similares no alinhamento de regiões codificadoras entre as espécies de Perciformes.

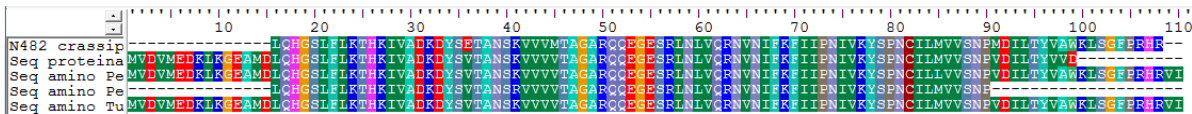


Figura 5. Alinhamento de seqüências de aminoácidos de LDH-A pelo programa CLUSTALW e Bioedit. *Pachypops trifilis* – pescada, *Plagioscion squamosissimus* – Pescada, *Cichla monoculus* – tucunaré, *Astronotus ocellatus* – Acará, *Astronotus crassipinnis* – Acará.

4. Conclusão

As seqüências obtidas a partir de fragmentos de amplificação do gene *LDH-A* apresentam regiões muito conservadas e regiões intrônicas distintas entre as espécies, o que pode contribuir para estabelecer parte da evolução molecular da LDH, principalmente aliada a futuras investigações aprofundadas de caracterização molecular com outras espécies de peixes e com os Genes de LDH-B e LDH-C.

5. Referências

Almeida-Val, V.M.F.; Val A.L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105B: 21-28.

Almeida-Val, V.M.F., Hochachka, P.W., 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrate. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 45-53.

Carvalho¹ C.S.; Rosa² Rubens.; Sassak K .T.; Bacila¹ Metry. 1998. Purificação e isoenzimas da Lactato desidrogenase do músculo epaxial de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglect*, *Arch. Vet. Scienc.* 3(1): 65-72.

Coppes, Z. 1992. Lactate dehydrogenase in teleosts. The role of LDH-C4 isozyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 673-677.

Edmunds, RC.2009. Comparative characterization of a temperature responsive gene (lactate

dehydrogenase-B, *ldh-b*) in two congeneric tropical fish, *Lates calcarifer* and *Lates niloticus*. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6):558-569

REHSE, P.H.; DAVIDSON, W.S. 1985. Purification and properties of a C-type isozyme of lactate dehydrogenase from the liver of the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 84B:145-150,.

TSUJI, S.; QURESHI, M.A.; HOU, E.W.; FITCH, W.M.; LI, S.S.L. 1994. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig, and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:9392-9396.

Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EUA. p. 633-664

Wittekindt N.E, Hortnagel K., Geltinger C., et al. 2000. Activation of the c-myc promoter P1 by immunoglobulin; gene enhancers in Burkitt lymphoma: functional characterization of the intron enhancer motifs ;B, E box 1 and E box 2, and of the 3' enhancer motif PU. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 800-808