

## IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE CODIFICANTE DA ENZIMA ANIDRASE CARBÔNICA 1 (CA1) EM PEIXES-REI (*Odontesthes humensis*, De Buen 1953).

EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN<sup>1</sup>; LUCAS DOS SANTOS DA SILVA<sup>2</sup>; BRUNA  
FAGUNDES BARRETO<sup>2</sup>; INGRID MEDEIROS LESSA<sup>2</sup>; TONY SILVEIRA<sup>2</sup>;  
VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – edu.ndell@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – lucassantos\_17@hotmail.com; brunaf.barreto@live.com;  
ingridmlessa@hotmail.com; williamwwe@yahoo.com.br; silveira.tlr@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O peixe-rei *Odontesthes humensis*, cujo habitat são lagoas costeiras e regiões de água doce, tem importância devido à comercialização de sua carne e pela pesca esportiva, além de ser um potencial biomodelo para estudos de toxicologia e de estresse ligado a aclimação em diferentes concentrações de salinidade da água (GARCÍA et al., 2014; ZEBRAL et al., 2017).

Dentre as diversas enzimas importantes na osmorregulação de peixes que são rotineiramente expostos a diferentes salinidades em seu habitat, podemos destacar a anidrase carbônica (CA), a qual é uma metaloenzima de zinco que atua na reação reversível que transforma CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em bicarbonato e um íon de hidrogênio carregado positivamente (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O ↔ HCO<sub>3</sub><sup>3-</sup> + H<sup>+</sup>) (GILMOUR, K. M., 2012). Dentre as isoformas presentes no organismo, a isoforma 1 da família alfa é estudada em peixes pela atuação na correção do balanço ácido-básico através de trocas iônica de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> com os produtos da reação com o dióxido de carbono (GILMOUR, K. M.; PERRY, S. F., 2009). Estudos comprovaram que a mesma realiza um importante papel em diferentes espécies de peixes que são transferidos de uma alta salinidade para uma salinidade menor, sendo relatado o aumento da expressão desse gene nas brânquias de algumas destas espécies (HAVIRD, J. C.; HENRY, R. P.; WILSON, A. E., 2013). No entanto, estudos de cunho genômico no peixe-rei ainda são escassos, dificultando um melhor entendimento acerca dos genes envolvidos na osmorregulação deste animal.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo realizar a caracterização molecular do gene CA1 através de sua clonagem molecular e sequenciamento, visando a utilização do mesmo para ensaios de PCR em tempo real, buscando elucidar as alterações pelas quais o organismo do peixe sofre ao ser submetido a um ambiente de alta salinidade.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 – Experimentação animal e coleta de tecidos

Os animais utilizados foram divididos em dois grupos, um aclimatado em água doce (0ppt) e outro aclimatado em água salobra cuja concentração de sal foi de 10ppt, ambos durante 4 semanas no Laboratório de Piscicultura da UFPel em Arroio Grande – RS. Após esse período eles foram trocados de tanques, onde o grupo aclimatado em água doce foi trocado para água salobra e viceversa. A coleta de tecidos se realizou nos dias 0 o qual representou o controle, 1, 7 e 15 desse experimento, onde os peixes foram anestesiados e eutanasiados conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel, sob número

de processo 7018/2015-85. Uma vez realizada a eutanásia, tecidos de interesse foram coletados tais como tecido branqueal, cerebral, hepatopancreático e renal.

## 2.2 – Extração de RNA, quantificação e confecção de DNA complementar

Após a coleta dos tecidos o tecido branquial seguiu para extração de RNA utilizando o reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA extraído seguiu para quantificação por espectrofotometria de luz UV utilizando o equipamento NanoVue (GE HealthCare, EUA) onde a concentração dessa amostra é calculada a partir da razão de absorbância de 260/280nm. As amostras que obtiveram parâmetros satisfatórios seguiram para confecção de DNA complementar (cDNA) utilizando kit comercial High Capacity (Life Technologies, EUA).

## 2.3 – Clonagem molecular

Para a realização da clonagem molecular do gene da CA1 foi realizado o desenho de *primers* específicos para a amplificação do gene de interesse em *O. humensis*, utilizando a ferramenta online *Prifi* (<https://services.birc.au.dk/prifi/>) a qual realiza o alinhamento deste mesmo gene a partir de espécies filogeneticamente próximas buscando regiões bem conservadas. Esses *primers* desenhados foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um gradiente de temperatura para determinar a melhor temperatura de anelamento dos *primers* desenhados e o DNA complementar (cDNA) confeccionado anteriormente como *template*. A fim de verificar os fragmentos de PCR amplificados foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 1,2%, onde logo em seguida, foi determinada a melhor temperatura de anelamento. Após a visualização das bandas amplificadas, estas foram excisadas do gel e purificadas utilizando *kit* comercial PureLink® (Invitrogen, EUA), que se baseia nas etapas de ligação, purificação e eluição em colunas de membrana de sílica.

## 2.4 – Sequenciamento, tratamento da sequência e identidade gênica

Após a purificação da amostra, esta seguiu para sequenciamento por método de Sanger automatizado no Laboratório de Genômica Estrutural na UFPEL. Logo após o sequenciamento, esta sequência bruta foi analisada no software ContigExpress (Vector NTI software, Thermo Fisher Scientific, EUA) o qual alinha a mesma amostra sequenciada de maneira senso e antissenso procurando formar uma única sequência linear de nucleotídeos sem falhas. Para verificar a identidade desse gene foi realizado um BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o qual compara a sequência do gene de interesse com o mesmo em outras espécies depositadas e disponíveis até então no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado do PCR em gradiente de temperatura foi possível definir que a temperatura mais apropriada de anelamento dos *primers* desenhados foi de 60,7 °C, visto que, pelo visualizado na eletroforese em gel de agarose, amplificou uma sequência de aproximadamente 601 pb com uma banda compacta, sem ampliações inespecíficas e sem degradação no produto.

Após definida as condições ideais para a clonagem molecular o produto das reações foi sequenciado resultando numa sequência consenso de 537 pb (Fig. 1) que já se encontra depositada pelo nosso grupo de pesquisa no GenBank, sob número de acesso KX035017.1.

```

1 atcgtacctg gcgaagcaaa atacgactct gggctgaagc cgctcaacct gaagtacgat
61 ccttccacca gcctcgacat cctcaacaac ggacattcct tccaagtacg cttcgttgat
121 gacaacgaca actcaactct gaaagatgga ccaatctcag gtatctacag gcttaagcag
181 ttccattttc actggggagc atctgatgac aagggtcttg aacatactgt ggctgggacc
241 aaataccctt ctgagctcca tctggtgcac tggaacacca aatatgccag ctttggtgaa
301 gctgccagtc agcctgatgg gctcgtggtt gttggagttt tcttgaaggt tgggtggtcaa
361 catgcaggtc tccagaaggt tattgatgct tttcaagcca ttaaggccaa aggaaaacag
421 accgactttc ccaacttcga ccttccata ttgctccctg ggtgcctaga ttactggaca
481 tatgacggct ctctaaccac acccctctg ctggagagtg ttacctggat tgtctgc

```

Figura 1: Sequência parcial do gene CA1 em *Odontesthes humensis* depositada no GenBank.

Como resultado do BLAST, foi demonstrado que a sequência depositada obteve uma identidade maior de 85% com as outras sequências depositadas de outras espécies, como ilustrado na figura abaixo (Fig. 2):

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Odontesthes humensis carbonic anhydrase 1 mRNA, partial cds</a>	992	992	100%	0.0	100%	<a href="#">KX035017.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Seriola dumerili carbonic anhydrase 1 (LOC111224337), mRNA</a>	599	599	100%	3e-167	87%	<a href="#">XM_022748784.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Acanthochromis polyacanthus carbonic anhydrase 1 (LOC110965781), mRNA</a>	566	566	100%	3e-157	86%	<a href="#">XM_022214935.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Lates calcarifer carbonic anhydrase 1 (LOC108900025), mRNA</a>	560	560	100%	1e-155	86%	<a href="#">XM_018700817.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Notothenia coriiceps carbonic anhydrase 1 (LOC104942383), mRNA</a>	555	555	100%	6e-154	85%	<a href="#">XM_010767598.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Stegastes partitus carbonic anhydrase 1 (LOC103367295), mRNA</a>	555	555	100%	6e-154	85%	<a href="#">XM_008295279.1</a>
<a href="#">Trematomus bernacchii carbonic anhydrase mRNA, partial cds</a>	532	532	100%	3e-147	85%	<a href="#">GQ443602.2</a>

Figura 2: BLAST realizado a partir da sequência depositada no Genbank, demonstrando que a sequência obteve identidade maior de 80%.

#### 4. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que o grupo de pesquisa obteve sucesso na clonagem molecular e no sequenciamento do gene codificante para a proteína anidrase carbônica 1 em peixe-rei *O. humensis*.

Estes resultados serão de suma importância nos experimentos já em andamento, os quais buscam elucidar os níveis de expressão do gene da AC, através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) em animais expostos a diferentes salinidades, o que poderá evidenciar de forma mais clara as possíveis mudanças fisiológicas sofridas no organismo quando ocorre a migração para ambientes onde esse peixe não é comumente encontrado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DINÇER, Barbaros et al. Characterization and inhibition studies of carbonic anhydrase from gill of Russian Sturgeon Fish (*Acipenser gueldenstaedtii*). **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1662-1665, 2016.

FIOL, Diego F.; KÜLTZ, Dietmar. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. **The FEBS journal**, v. 274, n. 22, p. 5790-5798, 2007.

GILMOUR, Kathleen M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 223-230, 2012.

GARCÍA, Graciela et al. Promiscuous speciation with gene flow in silverside fish genus *Odontesthes* (Atheriniformes, Atherinopsidae) from south western Atlantic Ocean basins. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104659, 2014.

GILMOUR, K. M.; PERRY, S. F. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 11, p. 1647-1661, 2009.

HAVIRD, Justin C; HENRY, Raymond P; WILSON, Alan E. Altered expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and other osmoregulatory genes in the gills of euryhaline animals in response to salinity transfer: a meta-analysis of 59 quantitative PCR studies over 10years. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 8, n. 2, p. 131-140, 2013.

KAYA, Elif Duygu; SÖYÜT, Hakan; BEYDEMİR, Şükrü. The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 825-832, 2015.

SOBJAK, Thaís Maylin et al. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p. 267-275, 2017.

SULUKAN, Ekrem et al. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77-85, 2017.

SUMI, Kanij R; NOU, Ill-Sup; KHO, Kang H. Identification and expression of a novel carbonic anhydrase isozyme in the pufferfish *Takifugu vermicularis*. **Gene**, v. 588, n. 2, p. 173-179, 2016.

YAO, Zongli et al. Carbonic anhydrase 2-like and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) under carbonate alkalinity stress. **Fish physiology and biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1491-1500, 2015.

ZEBRAL, Yuri D. et al. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. **Chemosphere**, v. 185, p. 860-867, 2017.