

IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO GENE NADH (ND2) EM PEIXES-REI (*Odontesthes humensis*, De Buen, 1953) ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO

LUCAS DOS SANTOS DA SILVA¹; BRUNA FAGUNDES BARRETO²; INGRID
MEDEIROS LESSA²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; TONY SILVEIRA²;
VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – lucassantos_17@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – brunaf.barreto@live.com; ingridmlessa@hotmail.com;
williamwwe@yahoo.com.br; silveira.tlr@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os herbicidas são amplamente utilizados para o controle de plantas daninhas em ecossistemas terrestres e aquáticos, porém, quando utilizados em concentrações não adequadas podem ser tóxicos para os animais.

O Roundup® é um herbicida não-seletivo, altamente solúvel em água, composto principalmente por glifosato, um sal de isopropilamina de glicina, comercializado desde 1974 (DUKE; POWLES, 2008). Este herbicida tem sido utilizado na oricultura, e devido ao seu sucesso no combate de plantas daninhas, foi inserido na sojicultura da região Sul do Rio Grande do Sul (RS). Entretanto, devido à sua solubilidade, o Roundup® não fica restrito apenas ao tratamento de culturas de interesse e acaba por se diluir em corpos d'água próximos e contaminar ambientes naturais, afetando espécies não-alvo (SALBEGO et al., 2010).

No passado, acreditava-se que este herbicida não era tóxico para animais, uma vez que age na via metabólica do ácido shiquímico presente exclusivamente em plantas (SHEHATA et al., 2013), inibindo a atividade da enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase, interferindo assim, na síntese de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano (AMRHEIN et al., 1980). No entanto, estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado os efeitos tóxicos que os herbicidas à base de glifosato causam em peixes quando expostos por curtos períodos (TOPAL et al., 2015) e também por longos períodos (LUSHCHAK et al., 2009). Registros similares já foram realizados inclusive em humanos (GASNIER et al., 2009).

O peixe-rei *Odontesthes humensis*, pertencente à família Atherinopsidae, é uma espécie distribuída na região Sul da América do Sul, em ambientes de água doce e lagoas costeiras. Além disso, este animal é rotineiramente exposto ao Roundup®, oriundo da lixiviação de ambientes agrícolas. Este peixe é um organismo potencial biomodelo interessante para estudos envolvendo ecotoxicologia, uma vez que é altamente exigente em termos de qualidade de água, podendo se destacar como bioindicador.

Buscando subsidiar estudos futuros em relação à análise da expressão de genes relacionados com ecotoxicologia, o gene NADH se mostra interessante para este fim, uma vez que o mesmo está envolvido em processos metabólicos como glicólise, síntese de ácidos graxos e respiração, transferindo elétrons para complexos localizados na membrana interna das mitocôndrias, responsáveis por bombear hidrogênio para o espaço intermembranar (KOBAYASHI; SHIMIZU, 1999 e NELSON; COX, 2014). Deste modo, este trabalho tem como objetivo, a clonagem molecular e o sequenciamento do gene NADH em peixe-rei *Odontesthes humensis*.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta de Tecidos

A coleta de tecidos de peixes-rei foi realizada no Laboratorio de Piscicultura na Barragem do Chasqueiro, pertencente a UFPel, que fica localizado no município de Arroio Grande (RS). Os animais utilizados no estudo, foram mantidos em tanques com volume de 1000 L, sob condições controladas e alimentação três vezes ao dia durante seu período de aclimação de três semanas e sua exposição de nove dias ao herbicida Roundup® em diferentes concentrações. Após a exposição, os peixes foram capturados, anestesiados com benzocaína e eutanasiados por secção medular e posterior retirada do tecido cerebral. Estes procedimentos foram aprovados pelo Conselho de Ética em Experimentação animal da UFPel, sob o nº de processo 7018/2015-85.

2.2 Extração de RNA e Confecção de DNA Complementar (cDNA)

Para a realização da técnica de Extração de RNA foi utilizado o reagente químico TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizando tecido branquial dos peixes-rei expostos às concentrações de 0mg/L (grupo controle), a 2mg/L, a 4mg/L e a 8 mg/L de herbicida Roundup®. Logo após a extração, a concentração e pureza das amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria de luz UV utilizando o equipamento *NanoVue™* (GE Healthcare, UK), para posterior confecção de cDNA utilizando o *kit* comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA).

2.3 Clonagem Molecular e Sequenciamento

Foram desenhados *primers* específicos para a amplificação do gene NADH utilizando a ferramenta *online* PriFi (<http://cgwww.daimi.au.dk/cgi-chili/PriFi/main>), baseando-se em sequências deste mesmo gene de espécies de peixes diferentes, as quais encontram-se depositadas no *GenBank*. Para a amplificação gênica, utilizou-se o cDNA confeccionado como *template* e os *primers* desenhados para realizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com gradiente na temperatura na etapa de anelamento dos *primers*, variando de 54°C a 64,2°C. A amplificação do gene NADH foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,2%, seguida de purificação utilizando o *kit* comercial *PureLink* (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras purificadas foram visualizadas por meio de corrida eletroforética, afim de determinar a melhor diluição a ser sequenciada pelo método de Sanger automatizado, no Laboratório de Genômica Estrutural, na UFPel.

2.4 Análise de Bioinformática

Após o sequenciamento, foi realizado um alinhamento das sequências brutas obtidas utilizando a ferramenta *ContigExpress* (Vector NTI Software, Thermo Fisher Scientific, EUA), afim de originar a sequência consenso definitiva do gene. Em seguida, para elucidar de qual gene e organismo a sequência é pertencente, utilizou-se a ferramenta *online* BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a qual realiza uma busca por sequências homólogas já depositadas no *GenBank*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das reações de PCR e da visualização em gel de agarose, pode-se verificar que a temperatura ótima de anelamento dos *primers* é de 60 °C, uma vez

que amplificou o fragmento de tamanho esperado, com 848 pares de base (bp). Posteriormente, foi realizada outra eletroforese em gel de agarose com diluição seriada para verificar a banda amplificada com maior definição, uniformidade e sem amplificações inespecíficas, e ainda com concentração adequada para ser sequenciada, onde a banda com diluição 10^{-7} foi selecionada para ser sequenciada (Figura 1).

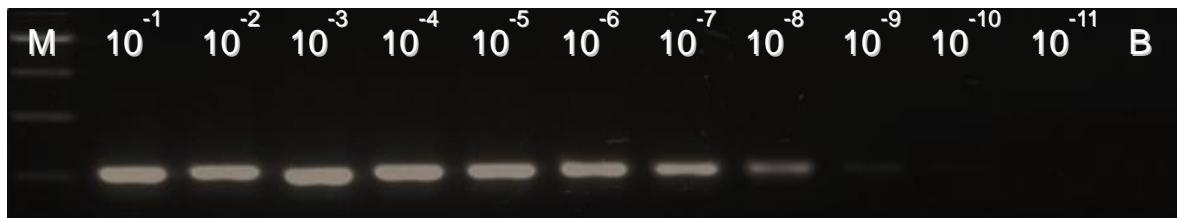


Figura 1: Gel de agarose na concentração de 1,2% demonstrando a amplificação do fragmento esperado com tamanho de 848 bp, diluição em série (10^{-1} a 10^{-11}) da amostra purificada, marcador de peso molecular (M) e controle negativo (B).

O sequenciamento revelou que o fragmento sequenciado com tamanho de 552 bp e analisado através de ferramentas de bioinformática é realmente pertencente ao gene NADH em *Odontesthes humensis*. Além disso, houve identidade acima de 78% com outras espécies de peixe-rei, tais como o *Odontesthes smitti*, *Odontesthes* sp., *Odontesthes mauleanum*, e também espécies como *Lutjanus rivulatus* e *Atherinella schultzi* (Figura 2).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Odontesthes humensis isolate LGE NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) mRNA, partial cds; mitochondrial	1020	1020	100%	0.0	100%	KX184716.1
Odontesthes sp. TJX-2014 mitochondrion, complete genome	798	798	100%	0.0	93%	KF791036.1
Odontesthes smitti isolate DDB3869 NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, partial cds; mitochondrial	771	771	100%	0.0	92%	KC736479.1
Odontesthes mauleanum isolate DDB3868 NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, partial cds; mitochondrial	760	760	100%	0.0	91%	KC736478.1
Odontesthes sp. Odsp-001 mitochondrial DNA, complete genome	726	726	100%	0.0	90%	AB370894.1
Lutjanus rivulatus mitochondrial DNA, complete genome	383	383	97%	3e-102	80%	AP006000.1
Atherinella schultzi isolate DDB3763 NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, partial cds; mitochondrial	381	381	97%	1e-101	79%	KC736449.1

Figura 2: Resultado de identidade do gene NADH de peixe-rei *Odontesthes humensis* com peixes de outras espécies.

A sequência pertencente ao gene NADH na espécie *O. humensis*, que foi sequenciada pelo nosso grupo de pesquisa encontra-se depositada no GenBank sob o número de acesso KX184716.1 (Figura 3).

Odontesthes humensis isolate LGE NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) mRNA, partial cds; mitochondrial

GenBank: KX184716.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS KX184716 552 bp mRNA linear VRT 20-JUL-2016
 DEFINITION Odontesthes humensis isolate LGE NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2)
 mRNA, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION KX184716
 VERSION KX184716.1
 AUTHORS Silveira,T.L.R., Domingues,W.B., Lessa,I.M., Silva,L.S.,
 Barreto,B.F., Robaldo,R.B., Collares,T.V., Seixas,F.K.,
 Dellagostin,O.A. and Campos,V.F.

Figura 3: Depósito da Sequência do gene NADH em peixe-rei *Odontesthes humensis* no GenBank.

4. CONCLUSÕES

Até o presente momento, todas as etapas de extração de RNA a partir de tecido branquial, bem como a clonagem molecular e o sequenciamento do gene de interesse foram realizadas com êxito. A partir dos resultados obtidos, nosso grupo de pesquisa pretende elucidar o efeito da contaminação do ambiente aquático com o herbicida Roundup® sobre a expressão de genes relacionados com toxicologia aquática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMRHEIN, N; SCHAB, J; STEINRÜCKEN, C. The mode of action of the herbicide glyphosate. **Naturwissenschaften**, v. 67, n. 7, p. 356-357, 1980.
- DUKE, O; POWLES, B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest management science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.
- GASNIER, C; DUMONT, C; BENACHOUR, N; CLAIR, E; CHAGNON, M; SERALINI, G. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.
- KOBAYASHI H; SHIMIZU S. Nicotinic acid and nicotinamide. **Nihon Rinsho**. v. 57, n. 1 p. 2211-2217.
- LUSHCHAK, V; KUBRAK, I; STOREY, M; STOREY, B; LUSHCHAK, I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, n.7, p. 932-937, 2009.
- NELSON, L; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.
- SALBEGO, J; PRETTO, A; GIODA, C; MENEZES, C; LAZZARI, R; NETO, J; BALDISSEROTTO, B; LORO, V. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n.3, p. 740-745, 2010.
- SHEHATA, A. A; SCHRÖDL, W; ALDIN, A. A; HAFEZ, H. M; KRÜGER, M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota *in vitro*. **Current microbiology**, v. 66, n. 4, p. 350-358, 2013.
- SOBJAK, M; ROMÃO, S; DO NASCIMENTO, Z; DOS SANTOS, P; VOGEL, L; GUIMARÃES, B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p. 267-275, 2017.
- TOPAL, A; ATAMANALP, M; UÇAR, A; ORUÇ, E; KOCAMAN, M; SULUKAN, E; CEYHUN, S. B. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.111, n.1, p.204-216, 2015.