

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO
E BIOLOGIA EVOLUTIVA - PPG-GCBE_v

Identificação de genes potencialmente envolvidos na formação do edema labial na espécie
Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) (Characiformes:Serrasalminidae)

DANIEL BARROS FAGUNDES

Manaus - Amazonas

Julho/2012

DANIEL BARROS FAGUNDES

Identificação de genes potencialmente envolvidos na formação do edema labial na espécie
Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) (Characiformes:Serrasalminidae)

Orientador: Adalberto Luis Val, Dr.

Financiamento: INCT/Adapta (processo nº 573976/2008-2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus - Amazonas

Julho/2012

F151 Fagundes, Daniel Barros
Identificação de genes potencialmente envolvidos na
formação do edema labial na espécie *Colossoma
macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes : Serrasalminidae)
/ Daniel Barros Fagundes. --- Manaus : [s.n.], 2012.
xx, 61 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) --- INPA, Manaus, 2012.
Orientador : Adalberto Luis Val
Área de Concentração: Genética, Conservação e Biologia
Evolutiva.

1. *Colossoma macropomum*. 2. Tambaqui. 3. Expressão
gênica – Edema labial. 4. Hipóxia aquática.
I. Título.

CDD 19. ed. 597.5

“Não pretendemos que as coisas mudem se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar “superado”. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais aos problemas do que às soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência. O inconveniente das pessoas e dos países é a esperança de encontrar as saídas e soluções fáceis. Sem crise não há desafios, sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um. Falar de crise é promovê-la e calar-se sobre ela é exaltar o conformismo. Em vez disso, trabalhem duro. Acabemos de uma vez com a única crise ameaçadora, que é a tragédia de não querer lutar para superá-la”

Albert Einstein

*Aos meus pais, Leopoldo (In memorian) e Maria Anísea (In memorian), estrelas que
brilham no céu e orientam meu caminho.*

Dedico

Agradecimento Institucional

Agradeço ao INCT/Adapta pelo financiamento deste trabalho; a CAPES pela concessão da bolsa de estudos; ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo apoio institucional; ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do INPA pela estrutura acadêmica; e ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) por toda estrutura física e suporte técnico laboratorial.

Agradecimentos

A Deus pelas pessoas, oportunidades e desafios colocados em meu caminho.

Aos meus irmãos, Leonardo e Rodrigo, pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigado pelo amor, ensinamentos e incentivos, vocês foram fundamentais na minha formação. Aos meus avós (*In memoriam*), tios e tias, primos e primas que contribuíram de alguma forma para minha educação. Às minhas “irmãs” Michele, Ivana e Nany, por torcerem pelo meu sucesso a cada desafio e aos meus sobrinhos Gabriel, Maria Clara e Rafael, que tornam minha vida muito mais feliz. Meu amor incondicional a todos vocês.

Ao meu orientador, Adalberto Luis Val, que me incentivou a vir para Manaus, acolhendo-me de braços abertos em seu grupo de pesquisas. Agradeço pelo convívio, ensinamentos, desafios e críticas, que me engrandeceram pessoal e profissionalmente.

A Vera Maria Fonseca de Almeida e Val pelo apoio, incentivo e oportunidades oferecidas.

A Maria de Nazaré Paula da Silva pela convivência, amizade, conselhos e por me ensinar muito do funcionamento do laboratório.

A Andrea Ghelfi pela ajuda com as análises de bioinformática e ensinamentos.

A todos da família LEEM pela contribuição neste trabalho. Agradeço o carinho, os momentos de descontração e a companhia, que tornaram meus dias mais felizes, diminuindo um pouco a saudade da família e amigos que estão longe. Em especial deixo um grande abraço para Daiani Kochhann, Alzira Miranda, Rafael Duarte, Ramon Baptista e Marcos Prado que sempre estiveram próximos, nos momentos difíceis ou não, conversando, discutindo e ajudando da melhor forma possível em todas as etapas do mestrado.

À turma de 2010 do mestrado em Genética Conservação e Biologia Evolutiva pelos agradáveis momentos passados juntos, em especial aos amigos Renato Lemgruber, companheiro de SOLiD, e Helber Astolpho e Pedro Rael, parceiros das inúmeras festas.

A todos os amigos de república que tive e tenho a satisfação de morar: Gilson, Graziela, Ana Paula, Aline, Marcos, “Griza”, Ricardo, Peter, “Chico Mário”, Reysi, Renata, Helber e Thiago.

Aos velhos amigos de Barbacena que sempre me apoiaram e participaram de minhas conquistas e aos novos amigos que fiz aqui em Manaus.

Muito obrigado a todos, pois essa conquista não é só minha, mas de todos vocês.

Resumo

As oscilações periódicas no nível dos rios amazônicos conferem dinamicidade às características fisiográficas e limnológicas da bacia. Com frequência, essas oscilações levam a variações marcantes nas concentrações de oxigênio dissolvido na água que podem ser observadas ao longo de um único dia, impondo à ictiofauna contínuos ajustes comportamentais, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos. Com o objetivo de compreender os mecanismos de formação da expansão labial, uma adaptação morfoanatômica comum a certos peixes da ordem Characiformes, foi proposta a análise em série da expressão gênica (SAGE) na Plataforma SOLiD™. Para isso, indivíduos da espécie *Colossoma macropomum* foram expostos à hipóxia aguda (0,3 mgO₂/L), permanecendo o grupo controle em condições normais de oxigenação (7,0 mgO₂/L). Em linhas gerais, os procedimentos práticos foram: (I) extração do RNA total do tecido labial; (II) preparo dos *pools* de amostras de RNA; (III) construção das bibliotecas SOLiD™ SAGE™; (IV) amplificação clonal *in vitro* das bibliotecas via ePCR; (V) enriquecimento das sequências amplificadas; (VI) sequenciamento; (VII) análises de bioinformática; e (VIII) categorização gênica. Dentre os resultados obtidos podemos destacar que mais de 115 milhões de *tags* foram sequenciadas e a partir delas foram obtidas 2,24 milhões de *tags* únicas. Após o alinhamento das *tags* únicas com as sequências de referência da espécie *Danio rerio* foi possível identificar 24014 genes, dos quais 51,24% ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -0,1$) apresentaram redução e 42,77% ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 0,1$) tiveram sua expressão aumentada durante as baixas tensões de oxigênio. A partir destes resultados foram selecionados 10 genes (HIF1A, ARNT, HIF1AN, VHL, VEGFC, VEGFR2, PLCG1, TRPC6, NOS1 e GUCY1A3) que participam direta ou indiretamente do aumento da permeabilidade microvascular, processo supostamente relacionado à formação do fenótipo em estudo. Sendo assim, propomos que a via metabólica para a expressão deste fenótipo inicia-se com a estabilização da proteína HIF1A e formação do heterodímero HIF1 após dimerização com a proteína ARNT. Em seguida, a proteína HIF1 se liga na região promotora do gene VEGFC estimulando sua transcrição. Depois de traduzida, a proteína VEGFC é reconhecida pelo receptor de membrana VEGFR2, que induz a síntese de DAG por meio da proteína PLCG1. A DAG promove a abertura dos canais catiônicos de membrana celular TRPC6, que facilitam o influxo de íons cálcio do meio extra para o intracelular. Este aumento na concentração de cálcio intracelular ativa a enzima NOS1 que passa a sintetizar NO, que por sua vez, ativa a enzima GUCY1A3, que converte GTP em GMPc, provocando o aumento dos níveis

intracelulares deste monofosfato. Como consequência ocorre a formação de vias transvasculares que permitem o extravasamento do plasma para a região intersticial, provocando o edema e a expressão do fenótipo em questão.

Palavras-chave: Hipóxia; SAGE; SOLiD; VEGFC; TRPC6; GUCY1A3.

Abstract

The periodic oscillation in the level of the Amazonian rivers confers dynamicity to physiographic and limnological characteristics of the Basin. Often, these oscillations lead to large variations in the concentrations of dissolved oxygen in the water that can be observed over a single day, requiring to the ichthyofauna continuous adjustments of behavioral, biochemical, physiological and morphological traits. To understand the mechanisms behind the lip expansion, a common morphological and anatomical adaptation to certain fish species belonging to the Characiformes order, it was proposed a serial analysis of gene expression (SAGE) on the SOLiD™ Platform. For this, individuals of *Colossoma macropomum* were exposed to acute hypoxia (0.3 mgO₂/L), keeping a control group under normal conditions of oxygen (0.7 mgO₂/L). Following, the general procedures were: (I) extracting RNA from lip tissue, (II) preparing pools of RNA samples, (III) constructing SOLiD™ SAGE™ libraries, (IV) *in vitro* clonal amplifying libraries by ePCR, (V) enriching amplified sequences, (VI) sequencing, (VII) bioinformatics analyzes and (VIII) gene categorization. Out of 115 million tags sequenced, 2.24 million were unique tags. After alignment of unique tags with the reference sequences of the species *Danio rerio* it was possible to identify 24014 genes, 51.24% ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -0,1$) repressed and 42.77% ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 0,1$) activated during under hypoxia. From these results we selected 10 genes (HIF1A, ARNT, HIF1AN, VHL, VEGFC, VEGFR2, PLCG1, TRPC6, NOS1 and GUCY1A3) that participate directly or indirectly in the process of increased microvascular permeability, favoring the lip expansion of the *C. macropomum* when exposed to low oxygen tensions. We propose that the pathway for the expression of this phenotype began with stabilizing protein HIF1A and formation of the heterodimer HIF1 after dimerization with ARNT protein. HIF1 then binds in the promoter region of the gene VEGFC stimulating your transcription. Once translated, the VEGFC is recognized by VEGFR2 receptor inducing the synthesis of DAG through PLCG1 protein. The DAG promotes the opening of cationic channels of TRPC6 cell membrane, facilitating the influx of calcium ions from extracellular to intracellular medium. This increase in intracellular calcium concentration which activates the enzyme NOS1 passes to synthesize NO. This activates the GUCY1A3 enzyme that converts GTP to cGMP, favoring increased levels of cGMP which induce the formation of transvascular pathways that facilitate plasma leaking into the interstitial region, thus causing swelling of the lower lip.

Keywords: Hypoxia, SAGE; SOLiD; VEGFC; TRPC6; GUCY1A3.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. A condição de hipóxia no ambiente aquático amazônico	1
1.2. Mecanismos de tolerância à hipóxia: modificações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas	2
1.3. O tambaqui e seus mecanismos de sobrevivência à hipóxia	4
1.4. Formação do edema labial.....	5
1.5. Sequenciadores de nova geração	6
1.6. Metodologia SAGE	7
2. Objetivos.....	9
2.1. Objetivo geral.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. Material e métodos.....	10
3.1. Aquisição e aclimação dos juvenis de tambaqui	10
3.2. Aclimação e fase experimental.....	10
3.3. Transporte dos animais após experimentação	11
3.4. Coleta de tecidos	11
3.5. Variáveis físicas e químicas da água.....	11
3.6. Extração de RNA	11
3.7. Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA.....	12
3.8. <i>Pools</i> de RNA total	13
3.9. Construção das bibliotecas SAGE.....	13
3.10. Determinação da qualidade e quantidade das <i>tags template</i>	14
3.11. PCR de emulsão (ePCR)	16
3.11.1. Considerações iniciais	16
3.11.2. PCR em emulsão e enriquecimento das <i>template beads</i>	18
3.12. Sequenciamento na Plataforma SOLiD™.....	20
3.13. Software de análise.....	21
3.14. Categorização dos genes	22
4. Resultados	23
4.1. Mortalidade	23
4.2. Determinação do período de experimentação	23
4.3. Características do lábio expandido.....	24

4.5. Dados do sequenciamento SOLiD™ e análise dos resultados gerados.....	25
5. Discussão	40
5.1. Modificação comportamental e morfológica do tabaqui frente à hipóxia.....	40
5.2. Dados do sequenciamento na Plataforma SOLiD™	40
5.3. Alterações fisiológicas reguladas pela expressão gênica	41
6. Conclusões	49
7. Perspectivas.....	50
8. Referências	51

Lista de Siglas

- Km²** - Quilômetros quadrados
- RSA** - Respiração na Superfície Aquática
- cm** - Centímetros
- Kg** - Quilogramas
- °C** - Graus Celsius
- mgO₂/L** - Miligramas de oxigênio por litro de água
- pH** - Potencial de Hidrogênio
- SOLiD™** - Sequenciamento por Ligação e Detecção de Oligonucleotídeos
- SAGE™** - Análise em Série da Expressão Gênica
- RNA_m** - Ácido Ribonucleico mensageiro
- cDNA** - Ácido Desoxirribonucleico complementar
- UTR** - Região não traduzida
- NCBI** - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
- RACE** - Amplificação Rápida das Extremidades do cDNA
- ESTs** - Etiquetas de Sequências Expressas
- BLAST** - Ferramenta de Busca Básica por Alinhamento Local
- L** - Litros
- g** - Gramas
- μL** - Microlitros
- ng/μL** - Nanogramas por microlitro
- ng-cm/μL** - Nanogramas-centímetro por microlitro
- V/cm** - Volts por centímetro
- p/v** - Peso por volume
- pb** - Pares de bases
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase

ePCR - Reação em cadeia da polimerase em emulsão

pM - Picomolar

pg/ μ L - Picogramas por microlitro

mM - Milimolar

nM - Nanomolar

μ M - Micromolar

U/ μ L - Unidades de enzima por microlitro

10^6 / μ L - Milhões de *beads* por microlitro

WFA - Análise de Fluxo de Trabalho

GO - Consórcio de Ontologia Gênica

HIF1A - Fator induzido por hipóxia 1, alfa

ARNT - Receptor nuclear translocador de hidrocarbonetos arilo

HIF1AN - Inibidor do fator induzido por hipóxia 1, alfa

VHL - Supressor de tumor von Hippel-Lindau

VEGFC - Fator de crescimento vascular endotelial C

VEGFR2 - Domínio do receptor de inserção da quinase

PLCG1 - Fosfolipase c, gama 1

TRPC6 - Receptor transitório potencial do canal de cátions, subfamília C, membro 6

NOS1 - Óxido nítrico sintase neuronal

GUCY1A3 - Guanilato ciclase 1, solúvel, alfa 3

Lista de Figuras

- Figura 1-** Tipos de expansão labial presente em peixes herbívoros, onívoros (A, B e C) e piscívoros (C e D) (Scarabotti *et al.*, 2011).....**3**
- Figura 2-** Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o RNA total de amostras de tecido labial de *Colossoma macropomum* nas condições de normóxia (N) e hipóxia (H). As setas indicam as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal.....**13**
- Figura 3-** Resultado da amplificação em gel de agarose 4%. (M) indica o marcador de peso molecular (10 pb DNA *Ladder* - 1µg/µL, Invitrogen, Cat. N° 10821-015). (T) *template*; (ST) sem *template*; e (SL) sem ligase. Número de ciclos de amplificação para normóxia (N10, N15 e N20) e hipóxia (H10, H15 e H20).....**16**
- Figura 4-** Concentração de oxigênio (mg/L) nos grupos controle (normóxia) e experimental (hipóxia) ao longo do tempo.....**23**
- Figura 5-** Indivíduos dos tratamentos (A) normóxia e (B) hipóxia. A seta na figura (A) indica o lábio não expandido. A seta na figura (B) indica o lábio expandido caracterizado por um inchaço arredondado na base do lábio e a presença de pequenos barbilhões laterais achatados com pequenas abas membranosas em sua borda posterior.....**24**
- Figura 6-** Normalização da quantificação das *tags* únicas para exemplares de tambaqui expostos a normóxia (Q1 = 6,4; Mediana = 8,2; Q3 =9,6) e hipóxia (Q1 = 6,3; Mediana = 8,1; Q3 = 9,6). *Tags outlier* ≤ 5% e ≥ 95%.....**26**
- Figura 7-** Dispersão dos genes em relação à concentração (eixo x) e ao nível de expressão (eixo y). Ambos os parâmetros estão representados em escala logarítmica na base 2. Pontos vermelhos indicam aumento ou repressão na expressão quando atribuído valores de referência ≥ 2 e ≤ -2 (eixo y). Pontos amarelos indicam concentrações inferiores a -25 e os pontos vermelhos próximos a eles indicam valores com expressão significativa entre ≥ 2 e ≤ -2 , com concentrações inferiores a -25 (eixo x).....**28**

Figura 8 - Dados brutos da categorização dos genes com expressão diminuída e aumentada no tecido labial de *Colossoma macropomum*.....**29**

Figura 9 - Processos biológicos: subcategorias comuns aos genes expressos nas condições de normóxia e hipóxia no tecido labial de *Colossoma macropomum*. A barra vermelha indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de hipóxia. A barra azul indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de normóxia. A diferença entre as porcentagens dentro de uma mesma subcategoria indica se houve aumento ou redução na quantidade de genes relacionados à hipóxia ou à normóxia na subcategoria analisada.....**33**

Figura 10 - Componentes celulares: subcategorias comuns aos genes expressos nas condições de normóxia e hipóxia no tecido labial de *Colossoma macropomum*. A barra vermelha indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de hipóxia. A barra azul indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de normóxia. A diferença entre as porcentagens dentro de uma mesma subcategoria indica se houve aumento ou redução na quantidade de genes relacionados à hipóxia ou à normóxia na subcategoria analisada.....**34**

Figura 11 - Funções moleculares: subcategorias comuns aos genes expressos nas condições de normóxia e hipóxia no tecido labial de *Colossoma macropomum*. A barra vermelha indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de hipóxia. A barra azul indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de normóxia. A diferença entre as porcentagens dentro de uma mesma subcategoria indica se houve aumento ou redução na quantidade de genes relacionados à hipóxia ou à normóxia na subcategoria analisada.....**35**

Figura 12- (A) Em normóxia a subunidade HIF1A é hidroxilada pela enzima HIF1AN e ubiquitinada pela proteína VHL, possibilitando assim sua degradação proteossômica. (B) Em hipóxia, a subunidade HIF1A se dimeriza no núcleo com a subunidade ARNT, formando o fator de transcrição HIF1, que irá ativar a transcrição de genes específicos para manutenção da homeostase do organismo exposto às baixas tensões de oxigênio.....**47**

Figura 13 - Esquema ilustrativo da possível via metabólica que explica a formação do edema labial na espécie *Colossoma macropomum*.....**48**

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Fases da PCR e parâmetros de ciclagem para a determinação do número mínimo de ciclos para a amplificação das *tags*.....15

Tabela 2- Componentes da PCR - como “*template*” foram utilizadas *tags* resultantes da ligação do adaptador B; para o controle negativo foram preparados dois tipos de reação, uma “sem *template*” e outra com *tags* provenientes da digestão com EcoP15I sem a ligação do adaptador B (“sem ligase”).....15

Tabela 3- Preparo da fase aquosa da ePCR. A concentração final é baseada no volume total de 2800µL, pois são incluídos 2720µL dos componentes líquidos e 80µL de SOLiD™ PI DNA Beads. Unidades: milimolar (mM); nanomolar (nM); micromolar (µM); unidades de enzima por microlitro (U/µL).....18

Tabela 4- Fases da PCR e parâmetros de ciclagem para a amplificação clonal.....19

Tabela 5- Valores dos parâmetros físicos e químicos da água mensurados nos tanques dos grupos normóxia e hipóxia. Medidas feitas durante as duas horas finais da fase experimental (pontos 8, 9 e 10 da figura 4), sendo os valores das médias obtidos a partir de 3 medidas por ponto para pH, temperatura e condutividade; e 5 medidas por ponto para a concentração de oxigênio. Os valores são apresentados como média ± SEM. * indica diferença estatística significativa em relação à normóxia (p<0,05).....25

Tabela 6 - Total de 12306 genes que apresentaram redução na transcrição na condição de hipóxia. (Log₂FC) indica o valor máximo e mínimo dos níveis de expressão dos genes transcritos nos exemplares de *Colossoma macropomum* expostos à hipóxia quando estes são comparados aos genes expressos nos exemplares expostos a normóxia. (X) indica aproximadamente em quantas vezes estes genes tiveram sua expressão reduzida.....27

Tabela 7 - Total de 10270 genes que apresentaram aumento na transcrição na condição de hipóxia. (Log₂FC) indica o valor máximo e mínimo dos níveis de expressão dos genes

transcritos nos exemplares de *Colossoma macropomum* expostos à hipóxia quando estes são comparados aos genes expressos nos exemplares expostos à normóxia. (X) indica aproximadamente em quantas vezes estes genes tiveram sua expressão aumentada.....27

Tabela 8 - Frequência dos genes com expressão gênica diminuída ou aumentada na condição de hipóxia em cada categoria do *Gene Ontology*. Total (%) indica o somatório das porcentagens dentro de cada categoria.....29

Tabela 9 - Processos biológicos: subcategorias exclusivas de genes com a expressão diminuída no lábio de *Colossoma macropomum* exposto à condição de hipóxia. Valores de porcentagem referentes aos dados brutos de categorização (total de 243%), com ponto de corte em valores $\geq 2\%$30

Tabela 10 – Processos biológicos: subcategorias exclusivas de genes com a expressão aumentada no lábio de *Colossoma macropomum* exposto à condição de hipóxia. Valores de porcentagem referentes aos dados brutos de categorização (total de 333%), com ponto de corte em valores $\geq 2\%$31

Tabela 11 – Funções moleculares: subcategorias exclusivas de genes com a expressão aumentada no lábio de *Colossoma macropomum* exposto à condição de hipóxia. Valores de porcentagem referentes aos dados brutos de categorização (total de 402%), com ponto de corte em valores $\geq 2\%$32

Tabela 12 - Nas colunas, da esquerda para direita, estão: os 10 genes selecionados; sua sigla de acordo com a nomenclatura oficial para a espécie *Danio rerio*, definida pelo “ZFIN Zebrafish Nomenclature Guidelines”; seu número de identificação no banco de dados do NCBI; o nível de expressão do tratamento em função do controle; sua categorização segundo *Gene Ontology* e seu número de acesso GO. Nas linhas da coluna “Categorização no Gene Ontology” são descritas as categorias de classificação no *Gene Ontology*, onde, CC indica “Componente Celular”; PB indica “Processo Biológico”; e FM indica “Função Molecular”. Dentro de cada categoria, é mencionada uma das subcategorias relacionadas ao gene descrito.....38

1. Introdução

1.1. A condição de hipóxia no ambiente aquático amazônico

A bacia amazônica é o maior sistema fluvial da Terra. Está distribuído ao longo de oito países do norte da América do Sul, abrangendo uma área superior a sete milhões de Km² (Sioli, 1990), dos quais, 4,4 milhões estão em território brasileiro. Dentre as características marcantes deste ecossistema estão as oscilações periódicas no nível de seus rios, que dão dinamicidade às condições fisiográficas e limnológicas da bacia. Essas oscilações são influenciadas pelos índices pluviométricos e por variações climáticas sazonais que conduzem ao degelo na cordilheira andina (Sioli, 1984; Junk *et al.*, 1989). Uma consequência direta disso é observada no período de enchente depois da inundação das áreas de planícies aluviais, onde são formadas as regiões de várzea e igapó, ricas em alimento para a ictiofauna e em matéria orgânica para decomposição. Isso estimula a migração dos peixes do canal principal dos rios para as regiões alagadas, além da multiplicação de microrganismos decompositores aeróbios. Em ambas as situações a demanda por oxigênio na água é aumentada, resultando na redução da disponibilidade de oxigênio dissolvido (Goulding, 1980; Sioli, 1984; Esteves, 1988; Sioli, 1990; Val *et al.*, 2004; Almeida-Val *et al.*, 2006). Além destas situações, existem outros fatores que possibilitam a formação e/ou agravamento desta condição de estresse. Dentre eles estão a formação de lagos temporários, o aumento da temperatura da água, a redução da taxa de fotossíntese e o aumento da respiração de macrófitas e fitoplâncton, a redução ou ausência de ventos e a baixa profundidade dos corpos d'água (Val, 1993; Almeida-Val *et al.*, 1999).

Todos estes fatores interferem na concentração de oxigênio dissolvido, de modo que variações marcantes na água podem ser observadas ao longo de um único dia (Almeida-Val *et al.*, 2000), impondo à ictiofauna contínuos ajustes comportamentais, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos (Val, 1993; Val, 1996; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Val *et al.*, 2004). Isso sugere que as variações no nível de oxigênio podem ter atuado como um agente seletivo durante a história evolutiva dos peixes, fazendo dos mecanismos de tolerância a hipóxia uma das adaptações mais importantes da ictiofauna amazônica (Almeida-Val *et al.*, 1993; Val, 1993; Val & Almeida-Val, 1995).

1.2. Mecanismos de tolerância à hipóxia: modificações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas

Os mecanismos de tolerância à hipóxia atuam preparando o organismo dos peixes para a condição de estresse. Eles são desencadeados logo que detectada a mudança no ambiente aquático, favorecendo os processos de captação e transporte de oxigênio por meio de modificações comportamentais, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (Sundin *et al.*, 2000; Val *et al.*, 2004; Florindo *et al.*, 2006).

Para sobreviverem durante os períodos de extrema hipóxia, várias espécies de peixe de respiração aquática obrigatória se expõem às camadas superiores da coluna d'água para captarem água rica em oxigênio, decorrente da contínua difusão do ar atmosférico. Esta modificação comportamental é conhecida como respiração na superfície aquática (RSA) (Kramer & McClure, 1982; Verheyen *et al.*, 1994) e é geralmente acompanhada por alterações bioquímicas e fisiológicas que permitem aos peixes enfrentar a baixa disponibilidade de oxigênio. Estas alterações bioquímicas e fisiológicas provocam: (I) o aumento da frequência cardíaca e do batimento opercular e conseqüente ampliação do volume respiratório; (II) contração do baço e liberação de eritrócitos jovens; aumento do volume do hematócrito e da concentração de eritrócitos; (III) redução dos níveis de fosfatos intraeritrocitários (ATP e GTP) e conseqüente aumento da afinidade do eritrócito pelo oxigênio; e (IV) redução do metabolismo (Saint-Paul, 1984; Val, 1986; Val, 1996; Rantin *et al.*, 1998; Val *et al.*, 2004).

Os mecanismos morfológicos estão associados, por exemplo, ao desenvolvimento de órgãos acessórios à respiração, possibilitando aos peixes de respiração aérea obrigatória e facultativa, a captação de oxigênio diretamente do ar atmosférico (Almeida-Val & Hochachka, 1995). Entre as modificações anatômicas ocorridas, podemos citar a redução significativa da superfície branquial e a suplementação por uma grande rede de capilares em certos órgãos, tornando-os aptos a realizarem trocas gasosas (Val, 1995). Como exemplos, são descritas as espécies: *Electrophorus electricus* (poraquê), que realiza as trocas gasosas na região buco-faringeana altamente vascularizada, e *Arapaima gigas* (pirarucu), que ainda alevino passa a respirar por meio da bexiga natatória modificada (revisto por Val & Almeida-Val, 1995).

A expansão labial é mais um tipo de alteração morfológica provocada pela falta de oxigênio no ambiente aquático. É uma modificação anatômica reversível e comum a algumas espécies de peixes pertencentes à ordem Characiformes, e não relacionada ao

desenvolvimento de grandes redes capilares locais destinadas às trocas gasosas (Braum & Junk, 1982; Val & Almeida-Val, 1995). Tem como função (hipotética) potencializar a captação de água durante a RSA, de modo a melhorar o fluxo hidrodinâmico da água que entra pela boca dos peixes em direção às câmaras branquiais (Braum & Junk, 1982; Winemiller, 1989; Val & Almeida-Val, 1995).

Segundo Braum e Junk (1982), a expansão labial é decorrente de um desequilíbrio na homeostase provocado pelo acúmulo de fluidos linfáticos nos espaços intercelulares dos tecidos da derme. Este edema pode ser percebido em questão de horas, com uma intensidade que varia de acordo com o tempo de exposição a hipóxia, por exemplo. Neste contexto, foram propostas categorias qualitativas de desenvolvimento da expansão, denominadas de (I) lábio típico, (II) intermediário e (III) plenamente desenvolvido (Winemiller, 1989).

Winemiller (1989) e Scarabotti *et al.* (2011), ao estudarem esta modificação em peixes coletados, respectivamente, na bacia de drenagem do rio Apure na Venezuela e na bacia do Paraná na Argentina, demonstraram que a morfologia externa do edema labial pode ser distinguida sob diferentes formatos, decorrentes de variações no tamanho corporal, formato da cabeça e posição da boca (Lewis, 1970). O primeiro tipo (A) foi caracterizado pela formação de um edema uniforme que torna o lábio ligeiramente arredondado quando observado dorsalmente; o segundo tipo (B) foi diferenciado por apresentar um edema irregular na porção rostral do lábio, além de dois grandes lóbulos arredondados na porção anterolateral; o terceiro tipo (C) foi tido como o mais elaborado por produzir um inchaço arredondado na base do lábio e a formação de dois barbilhões laterais achatados, com abas membranosas em sua borda posterior; o quarto tipo (D) foi caracterizado por formar projeções distais ao longo de toda a borda do lábio e, o último tipo (E), por apresentar lóbulos dorsolaterais descontínuos na porção rostral do lábio (Figura 1).

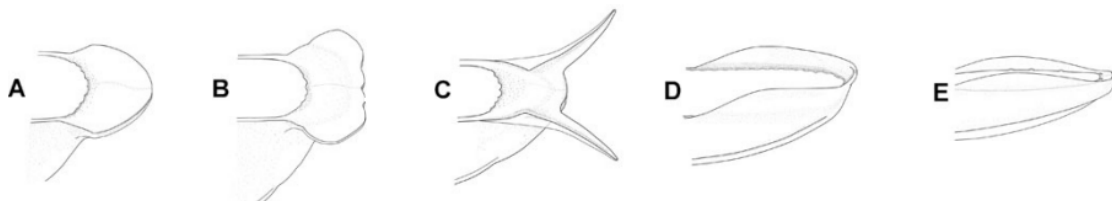


Figura 1- Tipos de expansão labial presente em peixes herbívoros, onívoros (A, B e C) e piscívoros (C e D) (Scarabotti *et al.*, 2011).

1.3. O tambaqui e seus mecanismos de sobrevivência à hipóxia

A espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), conhecida vulgarmente como tambaqui, pertence à Ordem Characiformes e à Família Serrasalmidae (Mirande, 2010). Quando adulto alcança porte máximo em torno de 100 cm de comprimento e peso superior a 30 kg (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Seu comportamento alimentar varia ontogeneticamente de zooplantófago para onívoro, com tendência a frugívoro (Carvalho, 1981; Araújo-Lima & Goulding, 1998). É um peixe nativo da bacia amazônica e do Orinoco. Apresenta comportamento migratório sazonal para reprodução e biologia especialmente adaptada às condições especiais encontradas nos diversos ecossistemas amazônicos (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Ferreira *et al.*, 1998; Val *et al.*, 2004).

Saint-Paul (1984) ao estudar as adaptações fisiológicas do tambaqui frente à hipóxia, determinou que a concentração de oxigênio crítica para a manutenção da rotina de consumo de oxigênio, a uma temperatura de 30 °C, é de 2 mgO₂/L, onde as pequenas flutuações neste nível de oxigenação são compensadas pelo aumento da taxa de ventilação branquial. Além disso, constatou que níveis de oxigenação inferiores a 0,5 mgO₂/L estimulavam a alteração do comportamento, favorecendo a RSA.

Se mantido nestas condições ($\leq 0,5$ mgO₂/L) o tambaqui passa a expressar o fenótipo da expansão labial em aproximadamente duas horas, quadruplicando o edema após 24 horas de exposição. Quando em recuperação, essa protuberância regride em até 70% em um intervalo de tempo semelhante ao observado para a expansão (Braum & Junk, 1982). Isto indica uma rápida resposta do organismo na regulação da expressão dos genes envolvidos na formação deste fenótipo. Vale ressaltar que exposições crônicas à hipóxia podem provocar a expansão labial em concentrações de oxigênio superiores às descritas acima, como observado por Val (1986) ao verificar a frequência de animais coletados com o lábio expandido na Ilha da Marchantaria/AM.

Val (1995), ao estudar os ajustes morfológicos e moleculares referentes à captação de oxigênio pela hemoglobina em *C. macropomum*, observou que os peixes expostos à hipóxia de 1,69 mgO₂/L, expressando o edema labial e impedidos de realizar a RSA, apresentaram uma redução de 30% na oxigenação do sangue arterial quando comparados aos peixes em hipóxia com acesso à lâmina d'água. Em contrapartida, essa diferença não foi significativa entre os animais da normóxia e hipóxia com acesso à superfície da água (RSA). Além disso, foi relatado o aumento nos índices de mortalidade nos animais impossibilitados de realizar a RSA por períodos superiores a 24 horas. Todas as observações citadas reafirmam a

importância da RSA para os peixes de respiração aquática obrigatória e a possível contribuição do lábio expandido na captação da água mais oxigenada existente na lâmina superficial da coluna d'água.

Quando avaliados os parâmetros hematológicos de exemplares de tambaqui coletados em ambientes com baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($\leq 0,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$), foi nítido o aumento do número de eritrócitos e do conteúdo de hemoglobinas (Saint-Paul, 1984), favorecendo o transporte dos gases da respiração. Assim como a redução significativa dos níveis de ATP e GTP intraeritrocitários, aumentando a afinidade da hemoglobina com o oxigênio (Val, 1986).

1.4. Formação do edema labial

As explicações para a formação do edema labial são puramente especulativas. Uma das hipóteses foi proposta por Val (1986), sugerindo que o incremento do produto final do metabolismo anaeróbico na corrente sanguínea poderia influenciar na formação da expansão labial, uma vez que a elevação do nível de ácido láctico provocaria a redução do pH sanguíneo, aumentando a permeabilidade dos vasos linfáticos, terminando com a expressão do fenótipo. Entretanto, Silva (1990) refutou tal hipótese e sugeriu que o processo desencadeador do edema seria sensível às variações de oxigênio no ambiente e não à sua disponibilidade orgânica.

Sudin *et al.* (2000), ao estudarem a denervação seletiva dos quimiorreceptores de oxigênio branquiais (nervos IX e X) do tambaqui e sua função na ativação das respostas adaptativas frente a hipóxia e hipercapnia, descobriram que estes nervos estão relacionados diretamente com a sinalização inicial para as alterações cardiorrespiratórias nas duas condições.

Florindo *et al.* (2006), além de estudarem os efeitos da denervação isolada dos quimiorreceptores de oxigênio branquiais (nervos IX e X) e orobranquiais (nervos V e VII) de *C. macropomum*, avaliaram a resposta provocada pela denervação conjunta dos nervos IX + X e V + VII frente a hipóxia crônica. Os resultados iniciais corroboraram os dados obtidos por Sudin *et al.* (2000). Quando avaliado o nervo V isoladamente perceberam que este está relacionado ao controle da respiração na superfície aquática. Além disso, observaram que nenhum dos tipos de denervação apresentou interferência na formação do edema labial, sugerindo que outros quimiorreceptores estejam envolvidos na formação do lábio ou que todos eles estejam, uma vez que não foi avaliada a denervação simultânea de todos os nervos.

Ao final, foi proposto que o mecanismo de formação do edema labial está relacionado com um efeito direto da hipóxia no tecido, o que contradiz a hipótese de Silva (1990).

Outros trabalhos corroboram a ideia da influência dos níveis de oxigênio interno na expansão labial, dentre eles os trabalhos de Farias (1992), Oliveira (2003), Menezes (2005) e Kochhann (2010). Nestes trabalhos foi observada a expressão do fenótipo mesmo em condições de normóxia experimental. Como conclusão para isso, os autores sugerem que o aumento do metabolismo, provocado pela exposição do tabaqui a elevadas temperaturas (Farias, 1992), ou a produção excessiva de muco nas brânquias (Oliveira, 2003; Menezes, 2005) quando o tabaqui é exposto em água com altas concentrações de cobre (McDonald & Wood, 1993; Heath, 1995; Lichtenfels *et al.*, 1996), ou o acúmulo de petróleo nas brânquias (Kochhann, 2010) causado pela exposição à fração insolúvel durante a RSA (Val & Almeida-Val, 1995) provocariam uma deficiência de oxigênio nos tecidos, levando a hipóxia sistêmica.

Assim como no edema labial do tabaqui, a compreensão dos mecanismos formadores de edema em tecidos humanos, em muitas situações é complexa e incompleta. Sabe-se que o edema pode ser localizado e envolver fatores que influenciam o fluxo direcionado de fluido para uma região em particular ou, ainda, estar relacionado a respostas secundárias de alteração dos mecanismos de controle do volume do compartimento extracelular e do líquido corporal total, situação que, na maioria das vezes, ocasiona edema generalizado (revisto por Coelho, 2004).

Para entender os processos de formação do edema labial no tabaqui será necessário compreender os mecanismos genéticos de adaptação desencadeados pela falta de oxigênio. Sendo assim, o emprego de ferramentas moleculares aliadas a algoritmos computacionais específicos serão de grande importância neste trabalho, pois possibilitarão a identificação, o mapeamento e a geração de perfis de expressão gênica entre as condições controle e experimental (Adams *et al.*, 1991; Telles *et al.*, 2001; Zeng & Gong, 2002).

1.5. Sequenciadores de nova geração

Por mais de três décadas o método de sequenciamento baseado em terminação de cadeia, desenvolvido por Sanger *et al.* (1977), tem sido uma das técnicas mais aplicadas na Biologia Molecular (Morozova & Marra, 2008). Entretanto, a partir do ano de 2007, com o advento dos sequenciadores de nova geração, tal técnica vem sendo gradualmente substituída pelos equipamentos de alto desempenho, denominados de sistemas “não-Sanger”. Estas novas metodologias proporcionaram a redução dos custos de sequenciamento e o aumento na

velocidade e quantidade de nucleotídeos sequenciados por corrida (Gupta, 2008; Mardis, 2008; Metzker, 2010).

Dentre estes equipamentos a Plataforma SOLiD™ (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) desenvolvida pela empresa *Applied Biosystems*, vem sendo utilizada no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular para a análise de diversos organismos da biota aquática amazônica, tendo como objetivo compreender seus mecanismos de adaptação frente às diversas condições impostas pelo ambiente (Projeto ADAPTA - processo nº 573976/2008-2).

Seu princípio de funcionamento é baseado em um esquema químico de hibridização e ligação (Hert *et al.*, 2008) utilizando DNA Ligase, processo diferente do método Sanger que utiliza DNA polimerase para o sequenciamento (Mardis, 2008). Além disso, na plataforma SOLiD™ todas as etapas de clonagem *in vivo* são substituídas pela amplificação *in vitro*, o que reduz consideravelmente o tempo gasto entre a construção das bibliotecas e a obtenção dos dados brutos do sequenciamento.

1.6. Metodologia SAGE

A análise em série da expressão gênica (SAGE™ - *Serial Analysis of Gene Expression*) (Velculescu *et al.*, 1995) é um método de alto rendimento, que possibilita a quantificação absoluta de cada transcrito em uma população de células. É amplamente utilizada no estudo de transcriptomas, permitindo com sucesso a análise de uma variedade de fenômenos biológicos por meio da investigação dos níveis de expressão do RNA mensageiro (RNAm) previamente identificado (Yamamoto *et al.*, 2001).

A metodologia SAGE consiste no sequenciamento de pequenos fragmentos do DNA complementar (cDNA), denominados *tags*, originados a partir da extremidade 3' UTR (3' *untranslated region*) do RNAm. Esta região contém informação suficiente para identificar um transcrito único após o alinhamento com as sequências de referência do organismo de estudo (Velculescu *et al.*, 1995; Pleasance *et al.*, 2003; Keime *et al.*, 2004), sequências estas obtidas no banco de dados de RefSeq do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq).

Nesta técnica desenvolvida por Velculescu *et al.* (1995) é possível analisar *tags* de 9-10 pb, com até 4¹⁰ possibilidades de combinações aleatórias de nucleotídeos, permitindo o mapeamento de 1.048.576 sequências diferentes em um único conjunto de transcritos, número superestimado se levado em consideração que os genomas de organismos superiores

codificam muito menos que este limite (estima-se que 1 *tag* = 1 gene). Entretanto, estas *tags* de 9-10 pb são muito curtas, o que dificulta as análises posteriores, principalmente se tiverem origem em um organismo não modelo (Yamamoto *et al.*, 2001). Em consequência disto, esta metodologia passou por sucessivas alterações com o intuito de aumentar ainda mais o tamanho das *tags* sequenciadas, elevando a confiabilidade dos resultados gerados, originando, por exemplo, as metodologias SAGE (Ryo *et al.*, 2000), LongSAGE (Saha *et al.*, 2002) e SuperSAGE (Matsumura *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2005), com respectivamente 14, 20 e 26 nucleotídeos na *tag*.

Em linhas gerais, a metodologia SuperSAGE possibilitou a análise de transcritos de organismos que não possuem um banco de dados de sequências de referência. Para isso, as *tags* resultantes do sequenciamento são utilizadas para o desenho de *primers* específicos para a amplificação por meio da técnica 3` RACE (3` *Rapid amplification of cDNA ends*), recuperando fragmentos mais longos de cDNA, que por sua vez, depois de sequenciados, podem ser utilizados para o alinhamento local em um banco de dados de sequências expressas (ESTs - *expressed sequence tags*) por meio do algoritmo de alinhamento local BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Isto permite a identificação dos genes de origem e confirmação dos resultados obtidos (Matsumura *et al.*, 2005).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar os transcritos diferencialmente expressos no lábio inferior do tabaqui após exposição dos animais à hipóxia, a fim de identificar os genes potencialmente envolvidos na formação do edema labial.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Selecionar genes possivelmente envolvidos na formação do edema labial.
- ✓ Propor uma via metabólica que explique a expansão labial, utilizando para isso os genes selecionados.

3. Material e métodos

3.1. Aquisição e aclimação dos juvenis de tambaqui

Juvenis de tambaqui foram doados pela Secretaria de Estado da Produção Rural (SEPROR) e transportados em sacos plásticos até o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), situado nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus/AM. No laboratório os peixes foram aclimatados durante cinco semanas em tanque de polietileno de 2000 L, contendo aproximadamente 900 L de água proveniente de poço artesiano, com fotoperíodo natural. Neste tanque o sistema de aeração e circulação de água foi constante. Para a alimentação dos peixes foi utilizada ração comercial contendo 36% de proteína bruta, fornecida uma vez por dia *ad libitum*.

3.2. Aclimação e fase experimental

Doze horas antes do experimento foi iniciado o período de aclimação pré-experimental. Vinte exemplares de tambaqui, com peso e comprimento médio de $27,5 \pm 7,0$ g e $13,5 \pm 0,7$ cm, foram distribuídos em dois tanques de polietileno de 130 L de capacidade, um para o grupo controle (normóxia) e outro para o experimental (hipóxia), permanecendo ambos em sistema fechado com aproximadamente 43 L de água (N=10).

Para a aeração foram utilizadas quatro mangueiras em cada tanque, posicionadas de modo a homogeneizar a dissolução do oxigênio na água. A injeção de ar no sistema foi regulada para que nos tanques a concentração final fosse próxima de $7,0$ mgO₂/L. Em seguida, na fase experimental, foi induzida a condição de estresse no tratamento hipóxia, permanecendo o grupo controle em condição semelhante à observada no período de aclimação pré-experimental. Para evitar a morte dos animais, a hipóxia foi estabelecida no grupo experimental de forma gradual depois da interrupção do sistema de aeração. Na redução do nível de oxigênio dissolvido não foi utilizada a injeção de nitrogênio gasoso na água, dessa forma, a concentração de $0,3$ mgO₂/L foi atingida a partir do consumo natural do oxigênio durante a respiração dos peixes. Depois de atingida a concentração desejada, não houve a necessidade de aeração da água para evitar a anóxia do sistema.

O tempo de exposição dos animais à hipóxia de $0,3$ mgO₂/L foi determinado pela expansão labial, onde, para padronização, duas horas depois de detectado o início do edema

em todos os indivíduos expostos à hipóxia, foi encerrada a fase experimental e iniciados os procedimentos para a coleta de tecidos.

3.3. Transporte dos animais após experimentação

Para evitar a reoxigenação transitória dos tecidos dos animais do grupo experimental, o transporte dos peixes do tanque até a sala de coleta de tecidos foi feito em câmara contendo água com a mesma concentração de oxigênio utilizada no experimento (aproximadamente 0,3 mgO₂/L). Deste modo, foram usadas simultaneamente duas câmaras, uma para o transporte dos peixes expostos à normóxia e outra para os peixes expostos à hipóxia, reduzindo assim possíveis alterações nos níveis de expressão gênica.

3.4. Coleta de tecidos

Os animais foram sacrificados por secção medular sem a utilização de substâncias anestésicas, pois estas, em sua maioria, derivadas do ácido p-aminobenzoico, provocariam hipóxia sistêmica (Tytler e Hawkins ap. segundo Delbon, 2006) alterando os resultados na análise da expressão gênica. Em seguida, o lábio inferior foi retirado do maxilar, utilizando para isso tesoura cirúrgica, e guardado em microtubo criogênico, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80 °C até o momento da extração do RNA total.

3.5. Variáveis físicas e químicas da água

Os parâmetros físico-químicos da água monitorados durante a fase experimental foram: potencial de hidrogênio (pH), temperatura, condutividade e concentração de oxigênio dissolvido. Para as medições dos valores de pH, a partir de triplicatas de amostras de água coletadas de hora em hora após o término da fase de aclimatação pré-experimental, foi utilizado pHmetro UB-10 (*Denver Instrument*). No mesmo intervalo de tempo, foram monitoradas, diretamente nos tanques, a temperatura, a condutividade e a concentração de oxigênio dissolvido na água por meio de termo-oxímetro 85 FT (*YSI*).

3.6. Extração de RNA

Nessa etapa do trabalho foi extraído o RNA total, de maneira individual, das 20 amostras de tecido labial de tambaqui, utilizando o protocolo *TRIzol® reagent (InvitrogenTM, Cat. N° 15596-018)*. O processo pode ser dividido em três etapas: na primeira foi realizada a lise celular, a dissociação das nucleoproteínas, inativação das RNases e retirada dos debris

celulares; na segunda etapa foi feita a limpeza da solução com a retirada dos solventes orgânicos e separação da fase aquosa e, por último, a precipitação em álcool e ressuspensão do RNA total em 20µL de água livre de nucleases.

3.7. Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA

Para a quantificação do RNA extraído foi utilizado espectrofotômetro *NanoDrop*® 2000 (*Thermo Scientific*) conforme orientações no manual do fabricante (*NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V1.0 user manual*, 2009). Por meio desse equipamento foram determinadas a concentração de RNA total e a pureza das amostras, análises estas baseadas nos valores de absorvância da luz nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

Para a determinação da concentração de RNA, em ng/µL, foi utilizada a equação da lei de Lambert-Beer modificada para o uso com unidades em ng-cm/µL.

$$C = (A \times \epsilon)/b$$

onde, **C** = concentração do ácido ribonucleico (ng/µL); **A** = valor da absorvância em 260nm; ϵ = coeficiente de extinção para RNA = 40 ng-cm/µL e **b** = caminho ótico = 1,0 cm.

A razão entre os valores das absorvâncias em 260nm e 280nm foi utilizada para verificar o grau de contaminação nas amostras de RNA extraídas, sendo que valores próximos de 2,0 indicam alto grau de pureza e valores abaixo de 1,8, contaminação por proteínas ou outras substância que absorvem fortemente, próximo ou no comprimento de onda de 280nm.

A integridade do RNA extraído foi verificada por meio de eletroforese a 4 V/cm em gel de agarose 1,0% (p/v). Para isso foi aplicado no gel aproximadamente 1000 ng de cada amostra, adicionada de 1,0µL do *front* de corrida (400µL de glicerol, 600µL tampão tris-acetato-EDTA, azul de bromofenol e 1µL de *GelRed*). Ao final, o gel foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital *L.PIX* (*Loccus* Biotecnologia).

Na análise quantitativa das amostras de RNA total extraído do tecido labial de *C. macropomum*, foram obtidos em média 1280,28 ± 467,98 ng/µL (média ± desvio), com grau de pureza de 1,99 ± 0,02 (média ± desvio). A análise qualitativa, representada pela figura 2, indicou a integridade das bandas 28S e 18S em todas as amostras extraídas. Com base nestes resultados as amostras foram validadas, permitindo a continuação dos procedimentos técnicos.

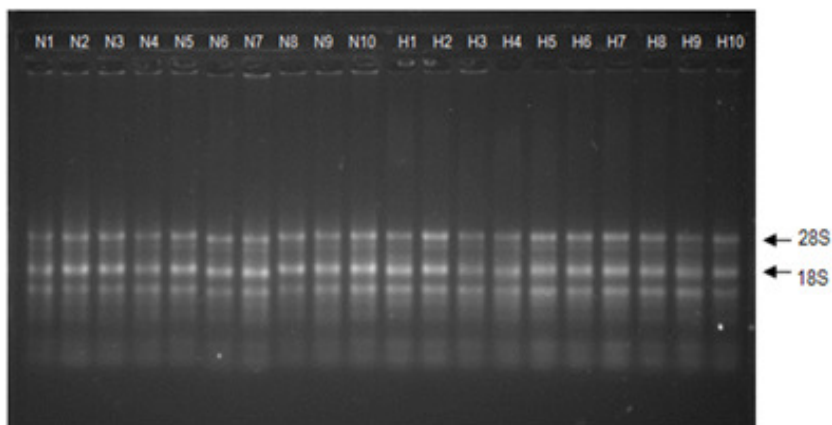


Figura 2- Eletroforese em gel de agarose 1% contendo o RNA total de amostras de tecido labial de *Colossoma macropomum* nas condições de normóxia (N) e hipóxia (H). As setas indicam as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal.

3.8. Pools de RNA total

Antes do início do protocolo que prepara as amostras para análise em série da expressão gênica (tecnologia *SAGE*TM) foram formados dois *pools* de RNA total, um para as amostras dos animais expostos a normóxia e outro para os expostos a hipóxia. Para isso foram misturados 2µg de RNA de cada uma das 10 amostras do mesmo tratamento em um único microtubo estéril. Essa estratégia garantiu uma quantidade adequada de RNA total (20µg) para as atividades subsequentes, além de reduzir o número de bibliotecas construídas para o sequenciamento.

3.9. Construção das bibliotecas SAGE

Para a conversão do conjunto de transcritos de RNA em bibliotecas de cDNA, sintetizadas a partir da porção 3' do RNAm, foi utilizado o kit “*SOLiD*TM *SAGE*TM” módulos A (*Part N*^o4443752), B (*Part N*^o4443753) e C (*Part N*^o4443754), conforme o manual “*SOLiD*TM *SAGE*TM *Guide*” (*Part N*^o 4443756AB, 2009).

Inicialmente os pools de RNA foram tratados com a enzima DNase I, eliminando possíveis contaminações por DNA. Em seguida foi realizada a separação do RNAm do RNA total utilizando *Dynabeads*[®] *Oligo(dT) EcoP*, um conjunto de microesferas magnéticas, onde cada uma é acoplada a um oligonucleotídeo calda poli (T). Após hibridização das *Dynabeads*[®] *Oligo(dT) EcoP* com a calda poli(A) do RNAm, foi feito o isolamento deste material por meio de estante imantada (*Invitrogen*), que promove a precipitação das microesferas magnéticas, permitindo a retirada do sobrenadante e purificação do RNAm.

Nas etapas de transcrição reversa do RNA poli(A) em cDNA fita simples, síntese da segunda fita da molécula de cDNA e degradação do RNA poli(A) foram utilizadas, respectivamente, as enzimas SuperScript® III Reverse Transcriptase, *E. coli* DNA polimerase, e *E. coli* RNase H. Já a quebra dos transcritos em sequências de referência (*RefSeq*) foi feita pela digestão do cDNA com a enzima Nla III, uma endonuclease de restrição de sequência específica, com sítios de ancoragem no genoma a cada 250 pb, aproximadamente, produzindo fragmentos com extremidade coesiva 3'-GTAC-5'.

Na inserção do adaptador A, com extremidade coesiva 5'-CATG-3', complementar à região digerida pela Nla III no cDNA, foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase. Esse adaptador possui o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição EcoP15I e uma sequência adaptadora interna, denominada IA, utilizada para o anelamento do *primer* 3' AMP (*primer* P2) nas reações em cadeia da polimerase convencional (PCR) e em emulsão (ePCR), além de possibilitar as etapas de enriquecimento e modificação 3' terminal (procedimentos demonstrados em tópicos posteriores).

Para gerar as sequências destinadas ao sequenciamento, foram retiradas as *Dynabeads® Oligo(dT) EcoP* dos fragmentos de modo a produzir um sítio para a inserção do adaptador B. Para isso, foi feita a digestão com a enzima EcoP15I, uma endonuclease de restrição do tipo III, que cliva a uma distância definida a jusante do sítio de reconhecimento, produzindo *tags* de 25-27 pb. No final, foi inserido o adaptador B na extremidade oposta ao adaptador A, utilizando a enzima T4 DNA ligase. Esse adaptador possui uma região denominada sequência P1 utilizada no anelamento do *primer* 5' AMP (*Primer* P1) durante a PCR e ePCR, além do sítio de iniciação para o sequenciamento na Plataforma SOLiD™.

3.10. Determinação da qualidade e quantidade das *tags template*

Ao término da construção das bibliotecas SOLiD™ SAGE™ foram realizadas ampliações (Tabela 1) do material *template* utilizando termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®)*, a fim de determinar o número ideal de ciclos para a obtenção de um produto puro, com aproximadamente 100 pb (27 pb do adaptador A + 25 a 27 pb da *tag* + 41 pb do adaptador B) e verificar a qualidade das bibliotecas construídas. Para isso foram preparadas três reações (Tabela 2) para cada biblioteca, sendo duas para controle negativo (sem *template*).

Tabela 1 - Fases da PCR e parâmetros de ciclagem para a determinação do número mínimo de ciclos para a amplificação das *tags*.

Fases	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	120	1
Desnaturação	95	30	Total de 20 (retirada de tubos nos ciclos 10, 15 e 20)
Anelamento dos <i>primers</i>	55	60	
Extensão	72	60	
Extensão final	72	300	1
Fim da PCR	4	∞	-

Tabela 2- Componentes da PCR - como “*template*” foram utilizadas *tags* resultantes da ligação do adaptador B; para o controle negativo foram preparados dois tipos de reação, uma “sem *template*” e outra com *tags* provenientes da digestão com EcoP15I sem a ligação do adaptador B (“sem ligase”).

Componentes	Reação experimental		
	<i>Template</i>	Sem <i>template</i>	Sem ligase
<i>Primer P1</i>	0,5	0,5	0,5
<i>Primer P2</i>	0,5	0,5	0,5
<i>Platinum® PCR SuperMix</i>	48	48	48
<i>Tags templates</i>	1,0	-	-
<i>Tag sem ligase</i>	-	-	1
Água livre de nucleases	-	1	-
Volume final	50	50	50

Após homogeneização estas reações foram divididas em três microtubos, totalizando nove reações por biblioteca, para que durante a ciclagem fosse retirado do termociclador um tubo “*template*”, um “sem *template*” e um “sem ligase”, sempre ao final das fases de extensão números 10, 15 e 20. O resultado foi validado por meio de eletroforese em agarose 4% (p/v) sob corrente de 5V/cm, sendo aplicado no gel 5µL do produto da PCR adicionado de 3,0µL do *front* de corrida. Ao final o gel foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital

L.PIX e escolhido como produto ideal, para ambas as bibliotecas, aquele amplificado em 10 ciclos de extensão, como podemos observar na figura 3.

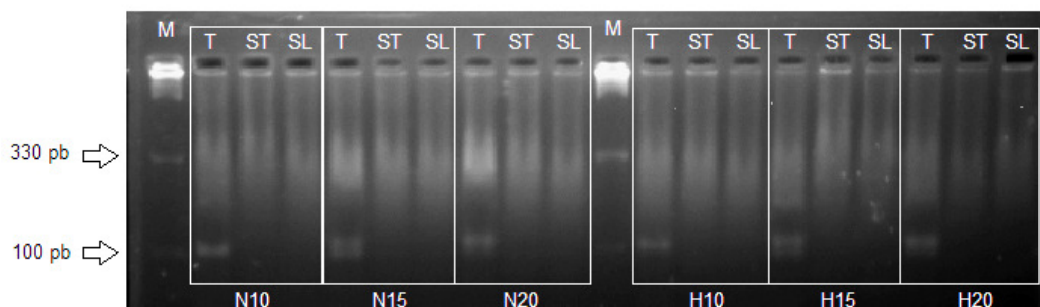


Figura 3- Resultado da amplificação em gel de agarose 4%. (M) indica o marcador de peso molecular (10 pb DNA Ladder - 1µg/µL, Invitrogen, Cat. N° 10821-015). (T) *template*; (ST) sem *template*; e (SL) sem ligase. Número de ciclos de amplificação para normóxia (N10, N15 e N20) e hipóxia (H10, H15 e H20).

A partir do número ideal de ciclos assim determinado, duas novas reações *template* (Tabela 2) foram preparadas. Os produtos da PCR foram então purificados por meio do “PureLink™ PCR Micro Kit” (Invitrogen, Cat. N° K3100-50) e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop® 2000, utilizando a equação de Lambert-Beer com coeficiente de extinção para DNA fita dupla, resultando em uma concentração média de 45 ng/µL (volume final igual a 50µL).

$$C = (A \times \epsilon) / b$$

onde, **C** = concentração do ácido ribonucleico (ng/µL); **A** = valor da absorbância em 260nm; ϵ = coeficiente de extinção para DNA = 50 ng-cm/µL e **b** = caminho óptico = 1,0 cm.

3.11. PCR de emulsão (ePCR)

A clonagem das *tags* de DNA pelo método de emulsão foi realizada conforme o manual “Template Bead Preparation Guide” (Part N° 4442695, 2009), utilizando kit SOLiD™ ePCR (Applied Biosystems®), caixas 1 (Part N° 4392171), 2 (Part N° 4392173) e 3 (Part N° 4392175).

3.11.1. Considerações iniciais

Previamente ao preparo das reações para ePCR (clonagem *in vitro*) foi considerada a possibilidade de formação dos diferentes tipos de microrreatores (monoclonais, policlonais, não clonais e *multibead*) e a influência desses na qualidade dos resultados. Os microrreatores

monoclonais são assim caracterizados por conter, além dos reagentes da PCR, uma única *SOLiD™ PIDNA Bead* e um único tipo de *tag template*, o que resulta em um produto de amplificação clonal homogêneo e ideal para o sequenciamento, enquanto os microrreatores policlonais possuem múltiplas *tags template* no mesmo microrreator, resultando em diferentes produtos de amplificação em uma mesma *SOLiD™ PIDNA Bead* e consequentes erros na leitura das fluorescências durante o sequenciamento. Já os microrreatores não clonais e *multibead* são assim chamados, respectivamente, por não possuírem *tags templates* e por apresentarem mais de uma *SOLiD™ PIDNA Bead* no microrreator, reduzindo a eficiência da amplificação e a área ocupada pelas *tags* clonadas na superfície das *beads*.

Em linhas gerais, o fator determinante na formação dos diferentes tipos de microrreator na emulsão é a concentração de *tags template* nas bibliotecas amplificadas (etapa 3.10 do material e métodos), sendo fundamental a diluição adequada deste material a fim de encontrar uma concentração ótima para que, na emulsão, se obtenha uma frequência maior de microrreatores ideais (monoclonais) em comparação aos não ideais (policlonais, não clonais e *multibead*). Dessa forma, para a ePCR, foram preparadas duas diluições de cada biblioteca amplificada, uma na concentração de 0,5 pM e outra de 1,0 pM, obedecendo a relação de que 60 pg/μL de *tags templates* equivalem a uma solução com concentração igual a 500 pM.

Outro procedimento prévio à ePCR foi a escolha da configuração da lâmina de sequenciamento a ser utilizada, com base na quantidade esperada de *beads* a serem amplificadas, assim como a definição da escala de preparação para a ePCR que atendesse o número total de *beads* para a deposição na lâmina de sequenciamento escolhida. Para isso, foi selecionada a lâmina de quatro poços, que permite a deposição de até 384 milhões de *beads* (96 milhões por poço) e a escala de preparação “*full*” (Tabela 3) que resulta em até 300 milhões de *template beads* amplificadas por diluição.

Tabela 3- Preparo da fase aquosa da ePCR. A concentração final é baseada no volume total de 2800 μ L, pois são incluídos 2720 μ L dos componentes líquidos e 80 μ L de SOLiD™ P1 DNA Beads. Unidades: milimolar (mM); nanomolar (nM); micromolar (μ M); unidades de enzima por microlitro (U/ μ L).

Componentes	Concentração da biblioteca		
	[] final	0,5 pM	1,0 pM
	Volume (μ L) / reação		
Tampão da PCR 10X	1X	280	280
dNTP Mix	14 mM	392	392
Cloreto de magnésio	25 mM	70	70
<i>Primer P1 ePCR</i>	40 nM	11,2	11,2
<i>Primer P2 ePCR</i>	3 μ M	16,8	16,8
<i>Template</i>	0,5/1,0 pM	2,8	5,6
Água livre de nucleases	-	1647,2	1647,2
<i>AmpliTaq Gold®</i> DNA polimerase	0,54 U/ μ L	300	300
Volume total	-	2720	2720

3.11.2. PCR em emulsão e enriquecimento das *template beads*

Após a diluição das bibliotecas, definição do tamanho da lâmina a ser utilizada e preparo das reações para a emulsão, foi adicionada na fase oleosa contendo agentes emulsificantes, a fase aquosa com os componentes da PCR e as SOLiD™ P1DNA Beads. Para promover a emulsão foi utilizado o equipamento *ULTRA-TURRAX® (IKA)*, um emulsificador que promove a mistura da fase aquosa na oleosa, formando os microrreatores para amplificação clonal *in vitro* das *tags template*. Em seguida a emulsão foi adicionada em placas de 96 poços e estas colocadas em termocicladores *GeneAmp® PCR System 9700*, programados conforme tabela 4 para a amplificação clonal do material *template* inicial.

Tabela 4- Fases da PCR e parâmetros de ciclagem para a amplificação clonal.

Fases	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ciclos
Desnaturação inicial	95	300	1
Desnaturação	93	15	
Anelamento dos primers	62	30	40
Extensão	72	75	
Extensão final	72	420	1
Fim da PCR	4	∞	-

Depois de completada a ePCR, os microrreatores na emulsão foram quebrados com 2-butanol e as *template beads* lavadas para a retirada do óleo contendo as substâncias emulsificantes. O enriquecimento das *beads* foi requerido para isolar as *template beads* (monoclonais e policlonais) das *beads* não amplificadas (não clonais). No enriquecimento foram utilizadas *beads* de poliestireno com sequências adaptadoras P2 de fita simples, complementares a região P2 do adaptador A nas *template beads*.

O complexo formado pelas *template beads* mais as *beads* de poliestireno foi separado das demais *beads* por centrifugação em glicerol 60%, isolando na fase superior as *beads* de poliestireno não ligadas; na fase intermediária, o complexo formado pelas *template beads* e as *beads* de enriquecimento; e na fase inferior as *beads* não amplificadas. Este complexo foi então extraído da solução e desnaturado para a dissociação das *template beads* das *beads* de poliestireno.

Ao final, foi retirada uma alíquota de cada amostra para leitura da absorbância no comprimento de onda de 600nm, de modo a determinar o número de *template beads* totais a serem aplicadas em cada poço da lâmina de sequenciamento. A concentração em milhões de *beads* por microlitro ($10^6/\mu\text{L}$) foi obtida após regressão linear em 6 (seis) pontos, com $r^2 = 0,992$, resultando em uma concentração média de $0,88 \times 10^6/\mu\text{L}$ em um volume final igual a $198\mu\text{L}$. A equação ficou assim definida:

$$C = 0,026 + 0,958 \times A_{600} \times 1$$

onde, $Y = C$ = concentração de *template beads* na amostra; A = absorvância onde a concentração é igual a zero = 0,026; B = coeficiente de inclinação da reta = 0,958 e $X = A_{600}$ = valor da absorvância em 600nm, com **Fator de diluição = 1**

Depois da quantificação, foi realizada uma modificação 3' terminal para neutralizar a região P2 das *template beads* destinadas ao sequenciamento. A reação ocorreu com a adição de 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (dUTP) pela ação da enzima terminal transferase. Para validar a qualidade das *template beads*, determinar a concentração ideal para o sequenciamento (0,5 e/ou 1,0 pM) e quantificar a eficiência do enriquecimento, foi realizada uma corrida prévia denominada *Workflow Analysis* (WFA), executando apenas o primeiro ciclo de ligação do sequenciamento. Para isso, foram depositadas isoladamente em cada quadrante da lâmina de sequenciamento as diluições de cada biblioteca, utilizando uma densidade aproximada de 19 milhões de *template beads* por poço.

Ao final da WFA todas as amostras foram validadas. Com base neste resultado, foram depositadas em uma nova lâmina de quatro poços, destinada ao sequenciamento, uma densidade aproximada de 96 milhões de *template beads* para cada diluição. Todos os procedimentos de utilização do sequenciador SOLiD™ foram realizados conforme o guia “*Intrument Operation Guide*” (Part N° 4442357 Rev. A, 2009).

3.12. Sequenciamento na Plataforma SOLiD™

O sequenciamento na plataforma SOLiD™ ocorre por hibridização de sondas curtas (8 bases) com as sequências *template* em cinco etapas distintas. Cada etapa possui sete ciclos, um para cada sonda ligada à *template*, o que permite sequenciar fragmentos de até 35 nucleotídeos. Para isso são utilizadas 1024 sondas randômicas marcadas com um dos quatro tipos de fluorescência, determinadas em função de dois nucleotídeos específicos presentes em sua extremidade 3'. Dessa forma, todas as combinações possíveis de dinucleotídeos são marcadas com apenas quatro fluoróforos, exigindo duas leituras de cada base para que a sequência do dinucleotídeo da sonda seja resolvida (revisto por Carvalho & Silva, 2010). Estes dois nucleotídeos são seletivos e determinam a ordem de hibridização das sondas na sequência alvo. Além destas duas bases, as sondas possuem três nucleotídeos degenerados em

todas as combinações possíveis, seguidos por mais três bases de inosina que carregam o fluoróforo marcador (revisto por Carvalho & Silva, 2010).

Como dito anteriormente, o sequenciamento ocorre em cinco etapas. Elas são divididas de acordo com o tipo de *primer* universal utilizado, onde a primeira etapa é caracterizada pelo uso de um *primer* com (n) bases, a segunda com (n-1) bases, a terceira com (n-2) bases e assim por diante até a quinta etapa com a utilização de um *primer* com (n-4) bases. Isto significa que após o anelamento do primeiro *primer*, o anelamento dos demais ocorre sempre com um nucleotídeo de recuo em relação ao *primer* anterior, o que possibilita sequenciar duas vezes cada nucleotídeo da sequência alvo, com exceção das bases número 0 (zero) e 35 (revisto por Carvalho & Silva, 2010).

O sequenciamento é iniciado com o anelamento do *primer* (n) na extremidade 3' do adaptador B, deixando livre a região da sequência *template* para a hibridização e ligação da primeira sonda por meio da enzima T4 DNA ligase. Após a inserção, o sinal da fluorescência correspondente é lido e as três últimas bases contendo a fluorescência são clivadas, iniciando o segundo ciclo de sequenciamento com a ligação de outra sonda, agora complementar à região posterior aos cinco nucleotídeos já ligados. Este procedimento ocorre até o final do sétimo ciclo, completando o sequenciamento dos 14 pb correspondentes à primeira etapa. A sequência de fita dupla formada é então desnaturada e uma nova etapa de sequenciamento é iniciada com o *primer* (n-1). Os ciclos de hibridização são repetidos fornecendo as informações de outras 14 bases da sequência *template*. Novas etapas de sequenciamento com os *primers* (n-2), (n-3) e (n-4) são realizadas até que toda a sequência seja determinada, resultando em 35 nucleotídeos sequenciados (revisto por Carvalho & Silva, 2010). É importante ressaltar que nas etapas 3, 4 e 5, após o anelamento do *primer*, ocorre a hibridização de uma sequência “ponte” evitando o sequenciamento de nucleotídeos do adaptador B, além de ajustar o anelamento das sondas em nucleotídeos ainda não sequenciados.

3.13. Software de análise

As *tags* sequenciadas foram analisadas no sistema operacional Linux por meio de um *pipeline* próprio desenvolvido pelo grupo de bioinformática do INCT/Adapta, destinado a análise de dados SAGE™ originados na Plataforma SOLiD™. O programa desenvolvido está sob processo de proteção no INPA e em breve sua descrição será publicada. Por isso, não serão descritos os detalhes da metodologia utilizada na análise dos resultados gerados.

3.14. Categorização dos genes

Após as análises iniciais de bioinformática, os genes foram categorizados de acordo com o *Gene Ontology Consortium* (GO). O GO (www.geneontology.org) utiliza uma nomenclatura sistemática e padronizada para a anotação de genes em vários organismos. O GO é dividido em três categorias que refletem aspectos conservados da biologia: processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares. Estes vocabulários contêm uma estrutura hierárquica de termos (subcategorias) designados para descrever o que o produto de um dado gene faz e onde está localizado na célula. Deste modo, os genes poderão ser anotados em mais de um termo de cada ontologia, uma vez que um gene pode ter mais de uma função, estar envolvido em uma variedade de processos biológicos, bem como desempenhar funções em vários locais na célula (Hill *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2002).

4. Resultados

4.1. Mortalidade

Ao longo das fases de aclimação pré-experimental e experimental não houve mortalidade dos animais utilizados, permanecendo o número amostral inicial de 10 indivíduos por tratamento.

4.2. Determinação do período de experimentação

Na figura 4 é possível visualizar a redução gradual da concentração de oxigênio no grupo experimental e a manutenção da concentração no grupo controle. Na escala de tempo, o ponto “7 horas” indica o momento em que é iniciada a RSA; e no ponto “8 horas”, o alcance da concentração de oxigênio determinada para a experimentação, bem como o momento aproximado onde os peixes começaram a expressar sinais visíveis da expansão labial. Ao final da fase experimental, ponto “10 horas”, iniciaram-se os procedimentos para a coleta de tecidos.

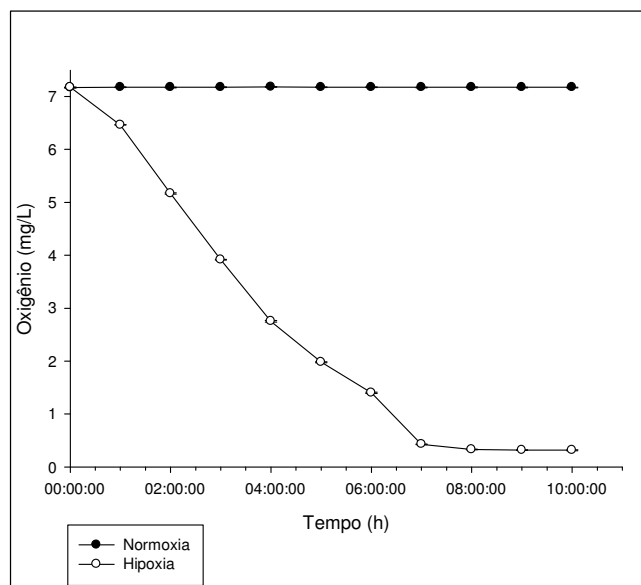


Figura 4- Concentração de oxigênio (mgO_2/L) nos grupos controle (normóxia) e experimental (hipóxia) ao longo do tempo.

4.3. Características do lábio expandido

Foi observado durante o experimento que dentre os 5 tipos de expansão labial, o que mais se assemelha ao lábio expandido de juvenis de tambaqui é a forma C da figura 1. Isto pode ser exemplificado na figura 5B.

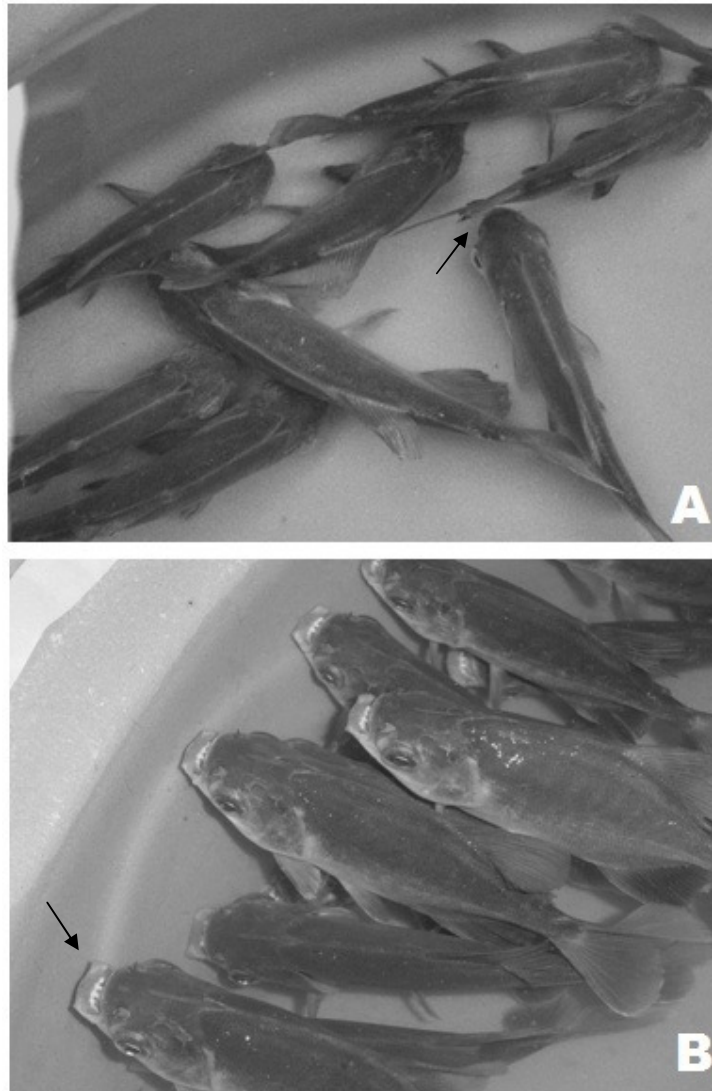


Figura 5- Indivíduos dos tratamentos (A) normóxia e (B) hipóxia. A seta na figura (A) indica o lábio não expandido. A seta na figura (B) indica o lábio expandido caracterizado por um inchaço arredondado na base do lábio e a presença de pequenos barbilhões laterais achatados com pequenas abas membranosas em sua borda posterior.

4.4. Parâmetros físicos e químicos da água

Os valores para os parâmetros físico-químicos da água são mostrados na tabela 5. Eles correspondem às médias das medições realizadas depois de atingida a concentração de oxigênio proposta para o grupo experimental (figura 4, pontos 8, 9 e 10 horas). Os valores obtidos para o pH, condutividade e concentração de oxigênio, no tratamento hipóxia, apresentaram diferença significativa quando comparados à normóxia. Note que a diminuição da concentração de oxigênio foi muito significativa ($P \leq 0,001$).

Tabela 5- Valores dos parâmetros físicos e químicos da água mensurados nos tanques dos grupos normóxia e hipóxia. Medidas feitas durante as duas horas finais da fase experimental (pontos 8, 9 e 10 da figura 4), sendo os valores das médias obtidos a partir de 3 medidas por ponto para pH, temperatura e condutividade; e 5 medidas por ponto para a concentração de oxigênio. Os valores são apresentados como média \pm SEM. * indica diferença estatística significativa em relação à normóxia ($p < 0,05$).

	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (μ S)	O ₂ (mg/L)
Normóxia	6,78 \pm 0,006	26,20 \pm 0,057	26,63 \pm 0,441	7,17 \pm 0,002
Hipóxia	6,36 \pm 0,007*	26,20 \pm 0,057	29,53 \pm 0,371*	0,32 \pm 0,004*

4.5. Dados do sequenciamento SOLiD™ e análise dos resultados gerados

Na Plataforma SOLiD™ foram sequenciadas aproximadamente 115 milhões de *tags* com média de 21pb de comprimento. Deste total, 70.293.721 *tags* pertencem à normóxia e 44.636.849 *tags* à hipóxia. Dentro de cada biblioteca, as *tags* de mesma sequência foram agrupadas e ordenadas resultando em 2.240.882 *tags* únicas, onde o número de repetições de uma mesma *tag* é igual à concentração de sua *tag* única na biblioteca analisada.

Com a normalização dos dados brutos foi possível determinar que 25% das *tags* únicas encontradas na biblioteca normóxia apresentaram até 87 repetições, contra 81 repetições na biblioteca hipóxia (Quartil 1, Figura 6). Diferença semelhante foi observada no terceiro quartil, onde 75% das *tags* únicas da biblioteca normóxia apresentam até 792 repetições, contra 797 repetições da biblioteca hipóxia (Quartil 3 - Figura 6).

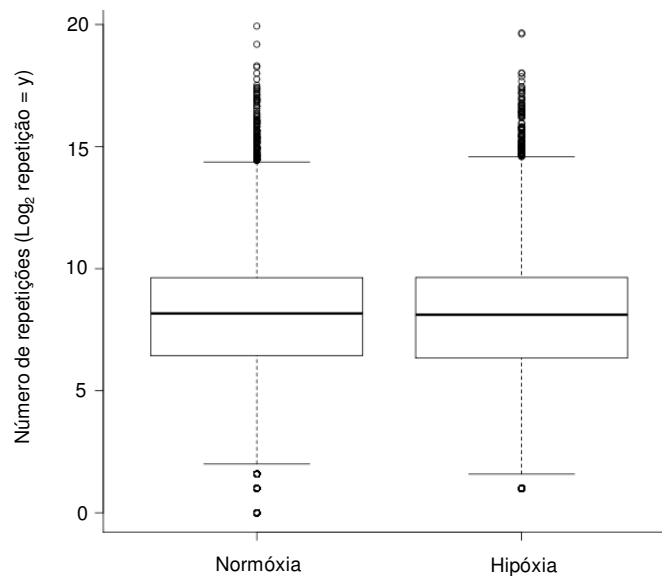


Figura 6 - Normalização da quantificação das *tags* únicas para exemplares de *Colossoma macropomum* expostos a normóxia (Q1 = 6,4; Mediana = 8,2; Q3 =9,6) e hipóxia (Q1 = 6,3; Mediana = 8,1; Q3 = 9,6). *Tags outlier* $\leq 5\%$ e $\geq 95\%$.

Para o alinhamento local foram utilizadas como referência as sequências da espécie *Danio rerio*, que possibilitaram identificar 24014 genes a partir dos mais de 2 milhões de *tags* únicas. A partir destes valores normalizados, foram calculados os valores da concentração (Log_2Conc) e dos níveis de expressão dos genes da hipóxia em função do controle (Log_2FC), ambos em escala logarítmica na base 2. De acordo com os resultados 51,24% ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -0,1$) dos genes apresentaram redução na expressão na condição de hipóxia; 5,99% ($\text{Log}_2\text{FC} = 0$) mostraram níveis de expressão similares entre as condições; e 42,77% ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 0,1$) tiveram sua expressão aumentada durante as baixas tensões de oxigênio (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Total de 12306 genes que apresentaram redução na transcrição na condição de hipóxia. (Log₂FC) indica o valor máximo e mínimo dos níveis de expressão dos genes transcritos nos exemplares de *Colossoma macropomum* expostos à hipóxia quando estes são comparados aos genes expressos nos exemplares expostos a normóxia. (X) indica aproximadamente em quantas vezes estes genes tiveram sua expressão reduzida.

Log ₂ FC	Redução na expressão (X)	Número de genes	%
-8,1	274	1	0,01
-7,0	128	1	0,01
-5,8 a -5,0	56 a 32	5	0,04
-4,8 a -4,0	28 a 16	26	0,21
-3,9 a -3,0	15 a 8	75	0,61
-2,9 a -2,0	7,5 a 4	381	3,10
-1,9 a -1,0	3,7 a 2	2247	18,26
-0,9 a -0,1	1,9 a 1,1	9570	77,76

Tabela 7 - Total de 10270 genes que apresentaram aumento na transcrição na condição de hipóxia. (Log₂FC) indica o valor máximo e mínimo dos níveis de expressão dos genes transcritos nos exemplares de *Colossoma macropomum* expostos à hipóxia quando estes são comparados aos genes expressos nos exemplares expostos a normóxia. (X) indica aproximadamente em quantas vezes estes genes tiveram sua expressão aumentada.

Log ₂ FC	Aumento na expressão (X)	Número de genes	%
0,1 a 0,9	1,1 a 1,9	7903	76,95
1,0 a 1,9	2 a 3,7	1858	18,09
2,0 a 2,9	4 a 7,5	395	3,85
3,0 a 3,9	8 a 15	83	0,81
4,0 a 4,9	16 a 30	24	0,23
5,1 a 5,7	34 a 52	4	0,04
6,2 a 6,3	73 a 79	3	0,03

As informações referentes ao nível de expressão de cada gene foram agrupadas às respectivas concentrações (número de repetições de uma mesma *tag*) e convertidas para a forma gráfica (Figura 7), sendo possível visualizar que poucos genes apresentam elevada dispersão, seja na concentração (Log₂ da concentração ≥ -10 e ≤ -20) ou na expressão (Log₂FC ≥ 2 e ≤ -2).

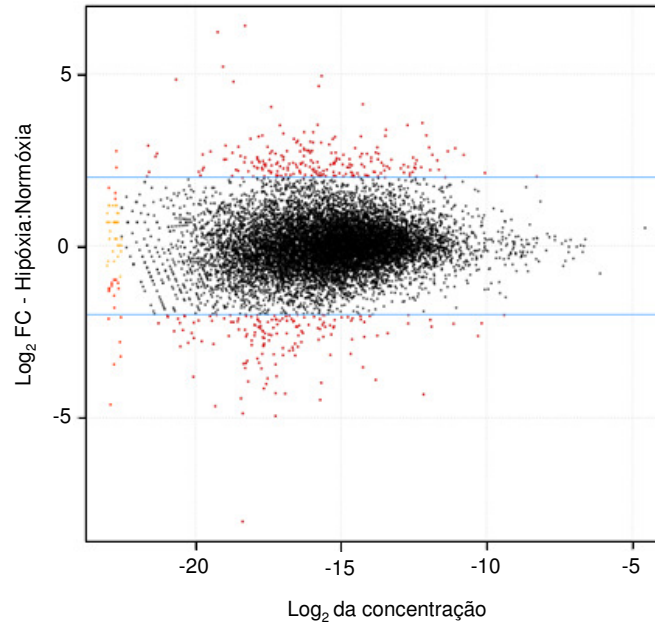


Figura 7 - Dispersão dos genes em relação à concentração (eixo x) e ao nível de expressão (eixo y). Ambos os parâmetros estão representados em escala logarítmica na base 2. Pontos pretos indicam genes com expressão com $\text{Log}_2\text{FC} < 2$ e > -2 . Pontos vermelhos indicam aumento ou repressão na expressão quando atribuído valores de referência com $\text{Log}_2\text{FC} \geq 2$ e ≤ -2 (eixo y). Pontos amarelos indicam Log_2 da concentração inferiores a -25 e os pontos vermelhos próximos a eles indicam valores com expressão significativa entre $\text{Log}_2\text{FC} \geq 2$ e ≤ -2 , com Log_2 da concentração inferiores a -25 (eixo x).

Para conhecer a ontologia dos genes identificados foi utilizado o banco de dados do *Gene Ontology* para a categorização dos transcritos expressos no tecido labial do tabaqui. Inicialmente foi feita a análise isolada do conjunto de genes diferencialmente expressos entre as condições de normóxia e hipóxia, que apresentaram $\text{Log}_2\text{FC} \geq 2$ (genes com expressão aumentada na condição de hipóxia) e $\text{Log}_2\text{FC} \leq -2$ (genes com expressão diminuída na condição de hipóxia), resultando nos dados brutos de categorização (Figura 8). Como resultado inicial, foi observado uma maior quantidade de subcategorias identificadas nos genes com expressão aumentada.

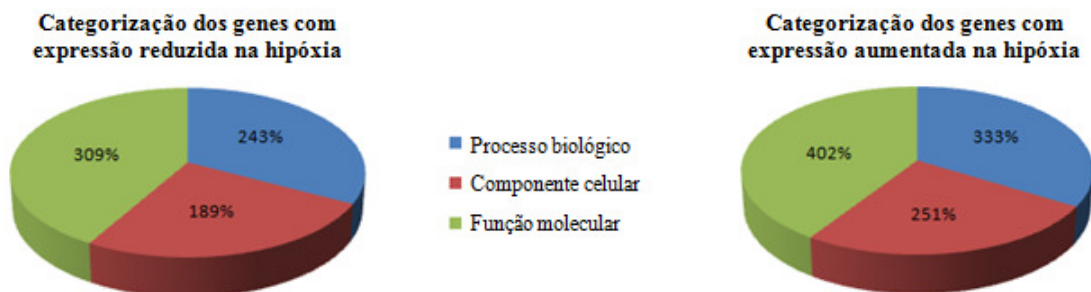


Figura 8 - Dados brutos da categorização dos genes com expressão diminuída e aumentada no tecido labial de *Colossoma macropomum*.

Com base na equação abaixo, foi feita a normalização das porcentagens dos dados brutos da categorização. No geral, podemos afirmar que 33,35% dos genes estão envolvidos em processos biológicos; 25,48% em componentes celulares; e 41,17% em funções moleculares (Tabela 8).

$$\% = C \times 100 / \Sigma$$

onde, % = porcentagem geral de genes com expressão diminuída ou aumentada de cada categoria; 100 = fator de correção para porcentagem e Σ = somatório das porcentagens de genes com expressão diminuída e aumentada em todas as categorias.

Tabela 8 - Frequência dos genes com expressão gênica diminuída ou aumentada na condição de hipóxia em cada categoria do *Gene Ontology*. Total (%) indica o somatório das porcentagens dentro de cada categoria.

Expressão gênica	Categorias do <i>Gene Ontology</i> (%)		
	Processo biológico	Componente celular	Função molecular
Diminuída	14,07	10,95	17,89
Aumentada	19,28	14,53	23,28
Total (%)	33,35	25,48	41,17

A seguir, estão representadas de forma individual, dentro de cada categoria (processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares), as subcategorias que só foram encontradas em um dos conjuntos de genes (expressão diminuída ou aumentada) expressos durante a hipóxia. Para isso, foram utilizados os dados brutos de categorização e selecionadas as subcategorias exclusivas de cada categoria que apresentaram valores de porcentagem ≥ 2 , ou seja, com 2% ou mais de genes em uma mesma subcategoria. Inicialmente, são

apresentados os resultados das subcategorias exclusivas dos genes com transcrição diminuída (Tabela 9) e aumentada (Tabela 10), pertencentes à categoria “**processo biológico**”.

Tabela 9 – Processos biológicos: subcategorias exclusivas de genes com a expressão diminuída no lábio de *Colossoma macropomum* exposto à condição de hipóxia. Valores de porcentagem referentes aos dados brutos de categorização (total de 243%), com ponto de corte em valores $\geq 2\%$.

Subcategorias exclusivas de genes reprimidos na hipóxia	% de genes envolvidos
Regulação positiva da transcrição, dependente de DNA	5
Adesão celular	3
Montagem dos nucleossomos	3
Dobramento de proteínas	3
Desenvolvimento de vasos sanguíneos	2
Processos celulares	2
Regulação positiva do processo de biossíntese de cAMP	2
Resposta a vírus	2
Processamento do RNAr	2
Iniciação da transcrição a partir do promotor da RNA Polimerase II	2
Aminoacilação do RNAt para a tradução de proteínas	2

Tabela 10 – Processos biológicos: subcategorias exclusivas de genes com a expressão aumentada no lábio de *Colossoma macropomum* exposto à condição de hipóxia. Valores de porcentagem referentes aos dados brutos de categorização (total de 333%), com ponto de corte em valores $\geq 2\%$.

Subcategorias exclusivas de genes ativados na hipóxia	% de genes envolvidos
Replicação do DNA	3
Divisão celular	2
Transporte de cloreto	2
Contração do coração	2
Resposta imune	2
Transporte intracelular de proteínas	2
Mitose	2
Migração de células do músculo	2
Nucleobases - Componente de processos metabólicos	2
Transporte de íons potássio	2
Estímulo de resposta ao dano no DNA	2
Resposta ao estresse oxidativo	2
Desenvolvimento de células do músculo estriado	2
Transporte mediado por vesículas	2
Expansão da bexiga natatória	2

Quando analisados os resultados brutos da categoria “**componente celular**” de genes que apresentaram redução na expressão (total de 189%), foram identificadas três subcategorias exclusivas (valores de porcentagem $\geq 2\%$), sendo uma relacionada aos processos de junção celular (2%) e duas à formação dos nucleossomos (2%) e dos fatores de transcrição (2%). Para os dados brutos de genes que apresentaram aumento na expressão nesta mesma categoria (total de 251%), foram identificadas cinco subcategorias exclusivas (valores de porcentagem $\geq 2\%$), estando elas relacionadas a genes que promovem o aumento do espaço extracelular (3%), bem como a formação do centrossomo (2%), da membrana interna das mitocôndrias (2%), do nucleoplasma (2%) e dos canais iônicos de potássio dependentes de alterações na voltagem celular (2%).

Entre os resultados brutos da categorização dos genes que apresentaram redução na expressão na categoria “**função molecular**” (total de 309%), foram observadas seis subcategorias exclusivas (valores de porcentagem $\geq 2\%$). Estas subcategorias estão relacionadas com atividade de aminopeptidase (2%), de hidrolase em anidridos ácidos (2%),

de metaloexopeptidase (2%), de metiltransferase (2%), de heterodimerização proteica (2%) e de transporte transmembranar (2%). Já as subcategorias exclusivas de genes que apresentaram aumento na expressão nesta categoria (total de 402%), são demonstradas na tabela 11.

Tabela 11 – Funções moleculares: subcategorias exclusivas de genes com a expressão aumentada no lábio de *Colossoma macropomum* exposto à condição de hipóxia. Valores de porcentagem referentes aos dados brutos de categorização (total de 402%), com ponto de corte em valores $\geq 2\%$.

Subcategorias exclusivas de genes ativados na hipóxia	% de genes envolvidos
Ligação proteica	3
Atividade de ligase de aminoácidos	2
Atividade de ATPase	2
Atividade de cisteína-endopeptidase	2
Atividade de cisteína-peptidase	2
Atividade de fator de crescimento	2
Ligação de íons ferro	2
Atividade de metaloendopeptidase	2
Atividade motora	2
Nucleobase - composto que contem atividade quinase	2
Atividade de fosfoproteína fosfatase	2
Ligação N-terminal de proteínas	2
Atividade de canal de potássio dependente de voltagem	2

A seguir, estão representadas dentro de cada categoria do *Gene Ontology*, as subcategorias que foram encontradas tanto para os genes com expressão aumentada ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 2$), quanto para os com expressão diminuída ($\text{Log}_2\text{FC} \leq -2$). No entanto, para estas análises, foram selecionadas apenas as subcategorias que apresentaram diferença na porcentagem de genes expressos entre estes parâmetros (Figuras 9, 10 e 11). Estes resultados indicam, dentro de cada subcategoria, a diferença quantitativa de genes que são expressos entre a condição de hipóxia e normóxia.

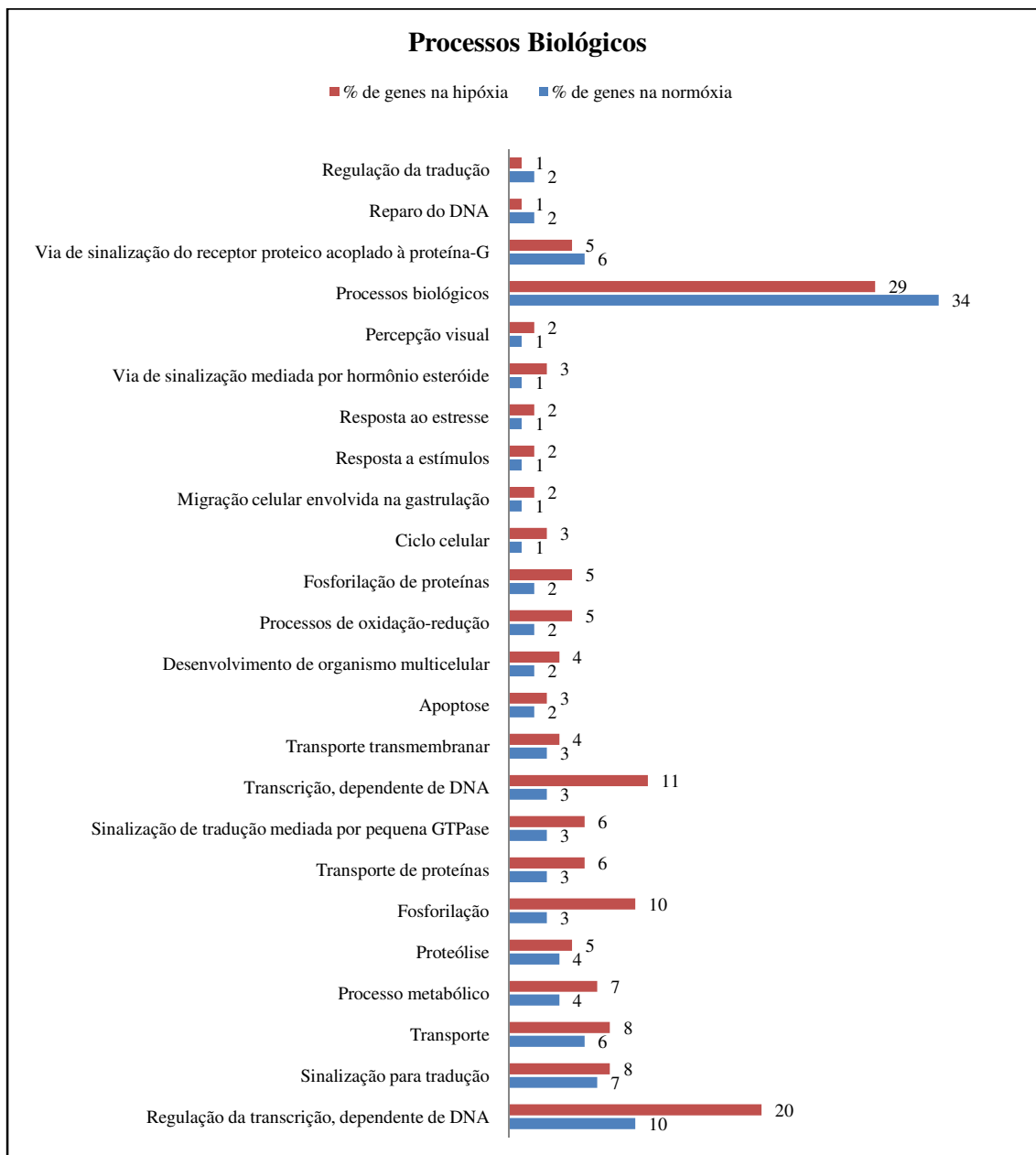


Figura 9 - Processos biológicos: subcategorias comuns aos genes expressos nas condições de normóxia e hipóxia no tecido labial de *Collossoma macropomum*. A barra vermelha indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de hipóxia. A barra azul indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de normóxia. A diferença entre as porcentagens dentro de uma mesma subcategoria indica se houve aumento ou redução na quantidade de genes relacionados à hipóxia ou à normóxia na subcategoria analisada.

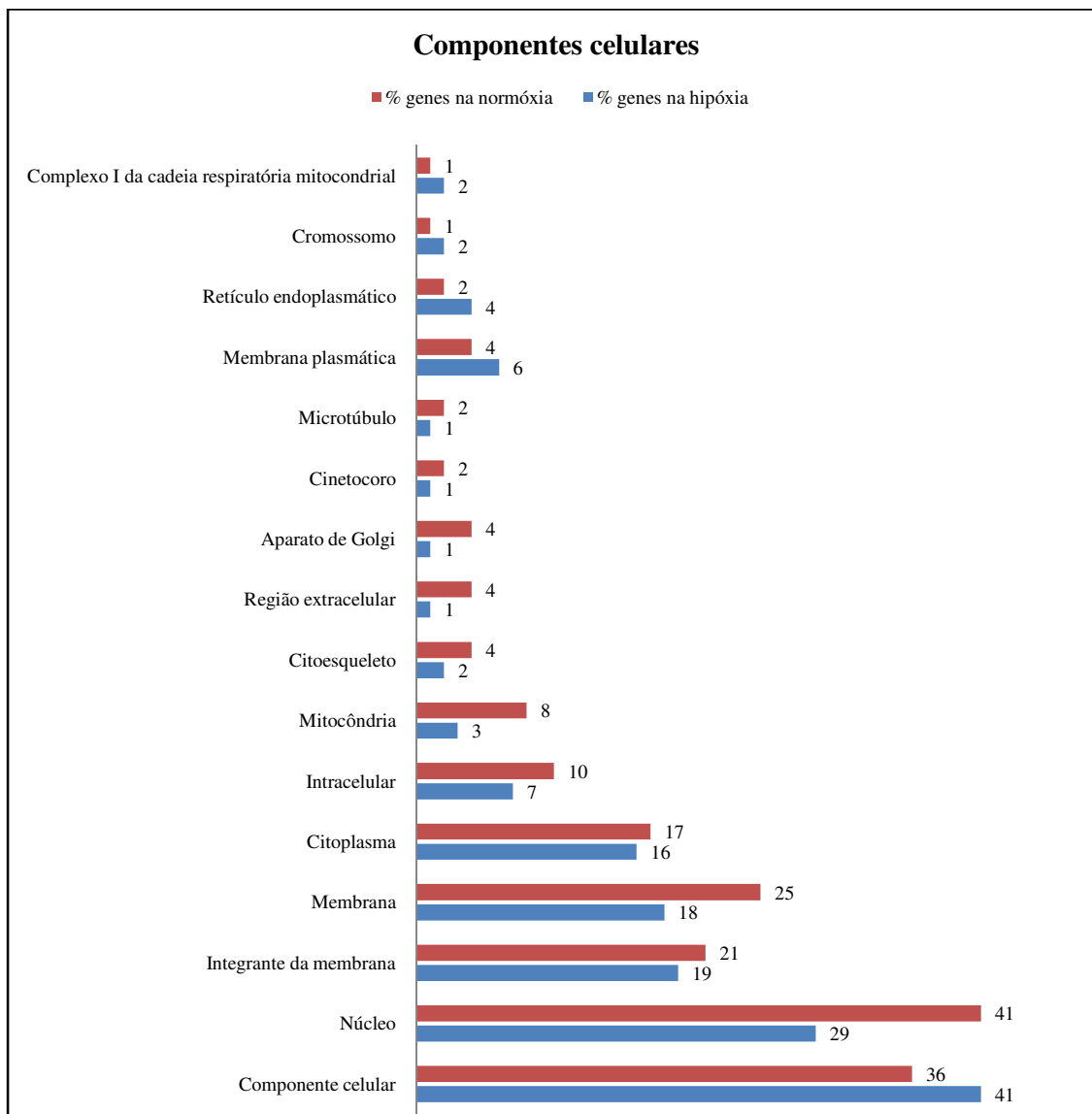
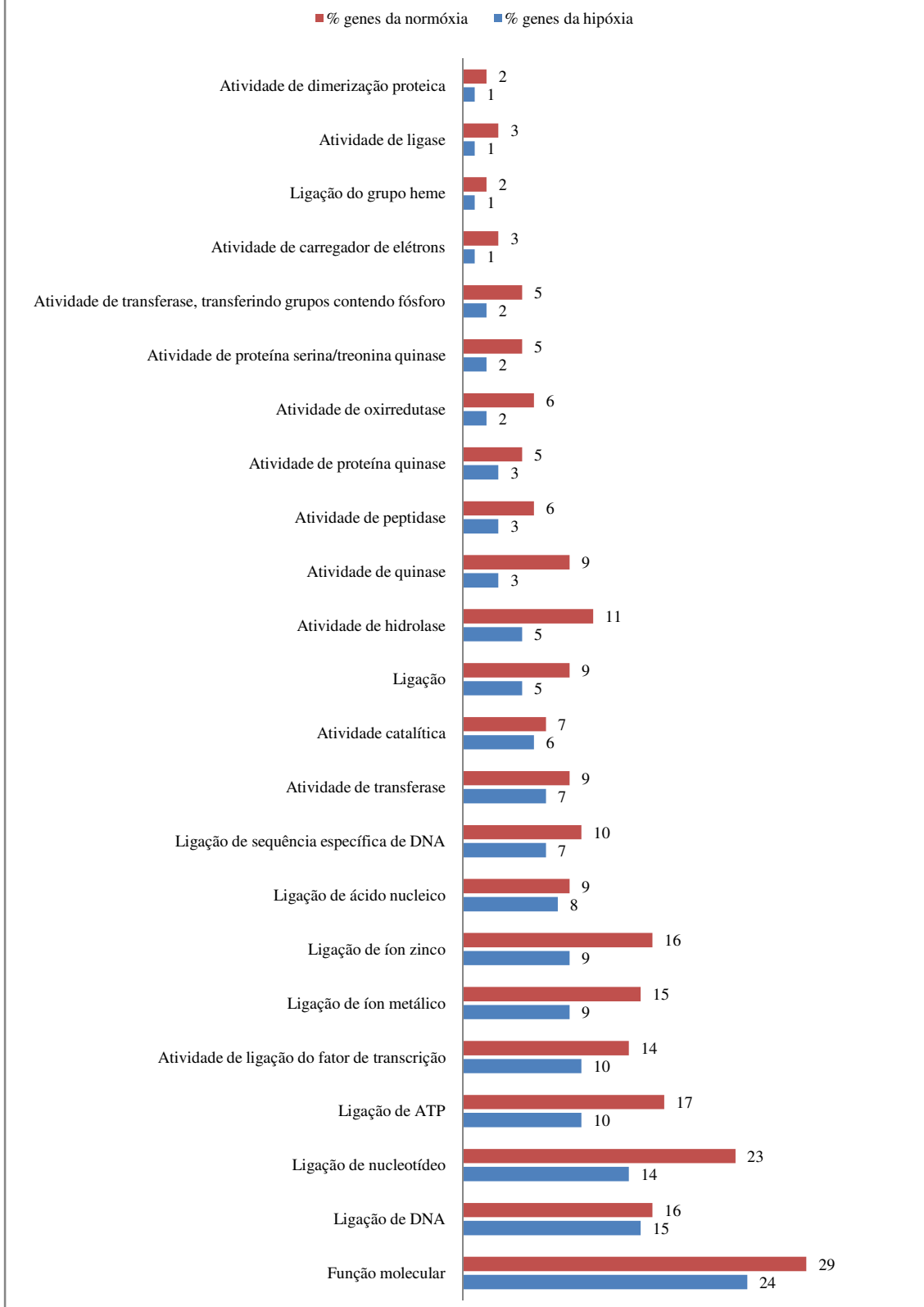


Figura 10 - Componentes celulares: subcategorias comuns aos genes expressos nas condições de normóxia e hipóxia no tecido labial de *Collossoma macropomum*. A barra vermelha indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de hipóxia. A barra azul indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de normóxia. A diferença entre as porcentagens dentro de uma mesma subcategoria indica se houve aumento ou redução na quantidade de genes relacionados à hipóxia ou à normóxia na subcategoria analisada.

Funções moleculares



(Continua)

(Continuação)

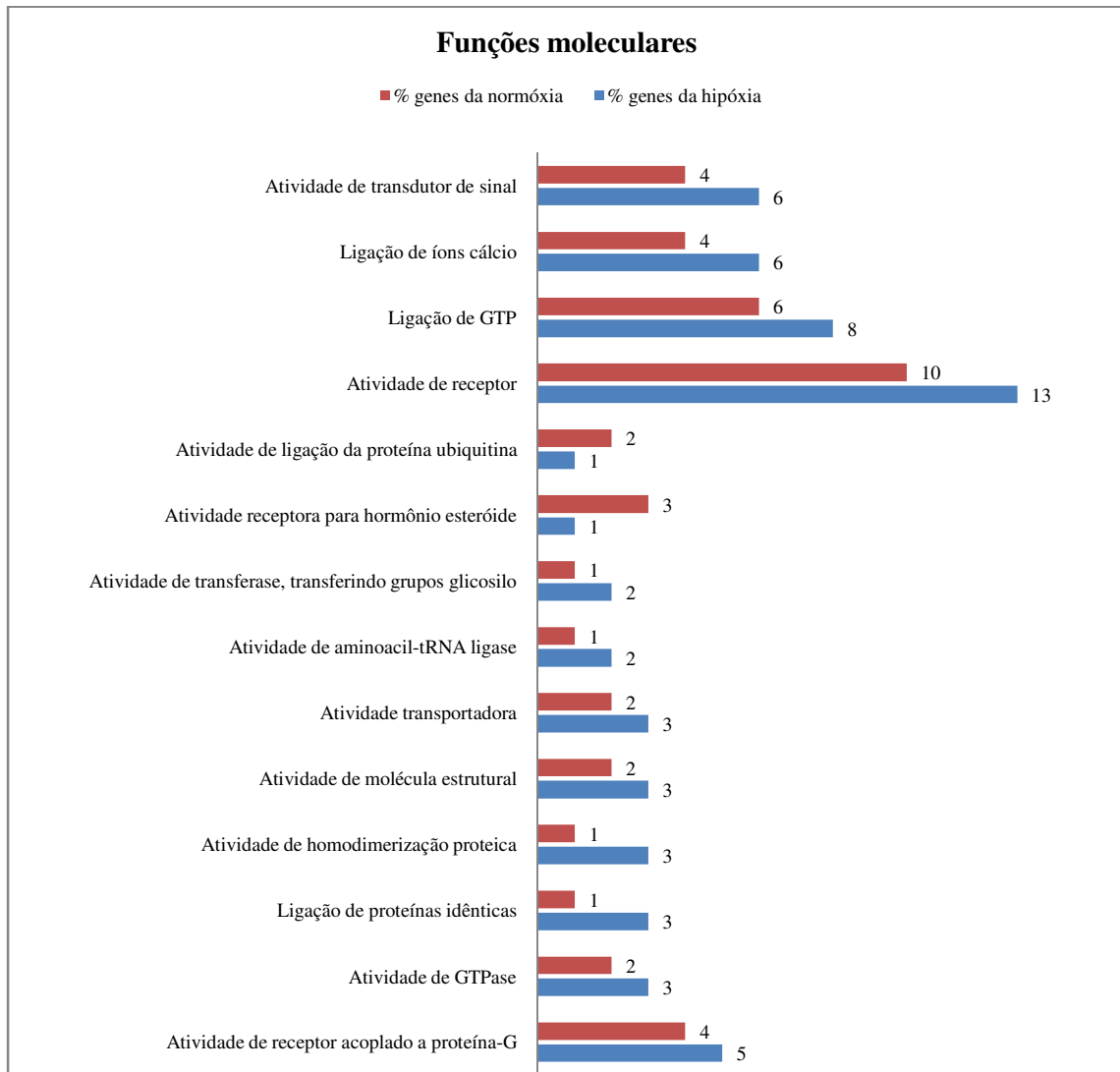


Figura 11 - Funções moleculares: subcategorias comuns aos genes expressos nas condições de normóxia e hipóxia no tecido labial de *Colossoma macropomum*. A barra vermelha indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de hipóxia. A barra azul indica a quantidade de genes (%) que são expressos dentro de cada subcategoria na condição de normóxia. A diferença entre as porcentagens dentro de uma mesma subcategoria indica se houve aumento ou redução na quantidade de genes relacionados à hipóxia ou à normóxia na subcategoria analisada.

Depois de observar os resultados da categorização dos genes foi possível indicar as subcategorias que apresentaram quantitativamente uma maior variação dentro de cada tratamento. Porém, durante a escolha dos possíveis genes envolvidos na formação do edema labial na espécie *C. macropomum*, não foi levada em consideração apenas essa variação

quantitativa na categorização, mas também a interação bioquímica dos produtos gênicos que explicassem a indução da formação do lábio expandido. Sendo assim, dentre os 24014 genes encontrados, foram selecionados 10 genes (Tabela 12) que estão possivelmente relacionados não só com acúmulo de líquidos no interstício, mas também envolvidos nos processos de regulação gênica que desencadeiam esta alteração fenotípica.

Tabela 12 - Nas colunas, da esquerda para direita, estão: os 10 genes selecionados; sua sigla de acordo com a nomenclatura oficial para a espécie *Danio rerio*, definida pelo “ZFIN Zebrafish Nomenclature Guidelines”; seu número de identificação no banco de dados do NCBI; o nível de expressão do tratamento em função do controle; sua categorização segundo *Gene Ontology* e seu número de acesso *Gene Ontology*. Nas linhas da coluna “Categorização no Gene Ontology” são descritas as categorias de classificação no GO, onde, CC indica “Componente Celular”; PB indica “Processo Biológico”; e FM indica “Função Molecular”. Dentro de cada categoria, é mencionada uma das subcategorias relacionadas ao gene descrito.

Gene	Sigla	Gene ID	Nível de expressão	Categorização no Gene Ontology	Acesso GO	
Fator induzido por hipóxia 1, alfa	HIF1A	393376	semelhante - 0,0 vezes	CC	complexo de fatores de transcrição	<u>GO:0005667</u>
				PB	resposta à hipóxia	<u>GO:0001666</u>
				FM	atividade de fator de transcrição	<u>GO:0000988</u>
Inibidor do fator induzido por hipóxia 1, alfa	HIF1AN	373126	redução - 1,62 vezes	CC	citoplasma	<u>GO:0005737</u>
				PB	hidroxilação peptidil-asparagina	<u>GO:0042265</u>
				FM	atividade oxidoreductase	<u>GO:0016491</u>
Supressor de tumor von Hippel-Lindau	VHL	791202	redução - 1,32 vezes	CC	núcleo	<u>GO:0005634</u>
				PB	ubiquitinação proteica	<u>GO:0016567</u>
				FM	ligação protéica	<u>GO:0005515</u>
Receptor nuclear translocador de hidrocarbonetos arilo	HIF1B ARNT	493634	semelhante - 0,0 vezes	CC	complexo de fatores de transcrição	<u>GO:0005667</u>
				PB	resposta à hipóxia	<u>GO:0001666</u>
				FM	coativador da transcrição	<u>GO:0003713</u>
Fator de crescimento vascular endotelial C	VEGFC	403049	aumento - 2,0 vezes	CC	espaço extracelular	<u>GO:0005615</u>
				PB	angiogênese	<u>GO:0001525</u>
				FM	atividade de fator de crescimento	<u>GO:0008083</u>

(Continua)

(Continuação)

Gene	Sigla	Gene ID	Nível de expressão	Categorização no Gene Ontology	Acesso GO	
Domínio do receptor de inserção da quinase	KDR VEGFR2	554230	aumento - 1,1 vezes	CC	membrana plasmática	GO:0005886
				PB	produção de vasos linfáticos	GO:0001945
				FM	receptor transmembranar	GO:0004714
Fosfolipase c, gama 1	PLCG1	373867	aumento - 1,1 vezes	CC	citoplasma	GO:0005737
				PB	sinalização da transdução	GO:0007165
				FM	atividade fosfolipase C	GO:0004629
Receptor transitório potencial do canal de cátions, subfamília C, membro 6	TRPC6	563989	aumento - 1,9 vezes	CC	integrante da membrana	GO:0016021
				PB	elevação do cálcio citosólico	GO:0007204
				FM	canal de cálcio	GO:0005262
Óxido nítrico sintase neuronal	NOS1 nNOS	60658	aumento - 1,2 vezes	CC	citoplasma	GO:0005737
				PB	resposta à hipóxia	GO:0001666
				FM	síntese de óxido nítrico	GO:0004517
Guanilato ciclase 1, solúvel, alfa 3	GUCY1A3	550420	aumento - 1,7 vezes	CC	citoplasma	GO:0005737
				PB	biossíntese de GMPc	GO:0006182
				FM	ligação ao GTP	GO:0005525

5. Discussão

5.1. Modificação comportamental e morfológica do tambaqui frente à hipóxia

O tambaqui quando exposto ao ambiente hipóxico ($0,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$) passa a realizar a tomada de água na superfície aquática a fim de suprir a demanda de oxigênio exigida pelo organismo (Saint-Paul, 1984). No entanto, com a manutenção desta condição de estresse ($\leq 0,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$), essa modificação comportamental (RSA) passa a ser aperfeiçoada pela expansão do lábio inferior, uma alteração morfológica denominada regionalmente de “aiú”, que tem como finalidade hipotética direcionar a água coletada da interface com o ar, aumentando assim o fluxo hidrodinâmico de água mais oxigenada que entra na boca em direção às brânquias (Braun & Junk, 1982). Com relação a isso, foi observado neste estudo que os animais do grupo experimental apresentaram a mudança no comportamento para a tomada de água mais oxigenada a partir do ponto sete horas (Figura 4), quando a concentração de oxigênio na água era próxima de $0,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$, corroborando os dados de Saint-Paul (1984). Além disso, uma hora mais tarde (ponto 8 horas) foram visualizados os primeiros sinais da formação do edema labial e duas horas depois (ponto 10 horas), a expansão labial propriamente dita (Figura 5B), confirmando os dados obtidos por Braun & Junk (1982).

Quanto a morfologia do lábio, são descritos cinco tipos de expansão labial para os peixes (Winemiller, 1989; Scarabotti, 2011). A partir de observações feitas após exposição dos animais à hipóxia, sugerimos que o lábio expandido do tambaqui se assemelha com o tipo C, representado esquematicamente na figura 1, uma vez que foi observado um inchaço arredondado na base do lábio e a presença de dois pequenos barbilhões laterais achatados, delimitados por pequenas abas membranosas em sua borda posterior. Tal descrição é semelhante, mas não idêntica à observada por Winemiller (1989) ao estudar indivíduos adultos do gênero *Triportheus*, coletados na bacia do Paraná, na Argentina, uma vez que o tamanho dos barbilhões e abas observadas por aquele, diferem daqueles visualizados no lábio dos juvenis de tambaqui, neste trabalho.

5.2. Dados do sequenciamento na Plataforma SOLiD™

Após sequenciamento das bibliotecas SAGE™ na Plataforma SOLiD™ e análises de bioinformática, foram identificados mais de 2 milhões de tags únicas e aproximadamente 24

mil genes. Estes números são superiores aos encontrados quando utilizada a técnica SAGE™ e sequenciamento em sistemas Sanger (Madden *et al.*, 1997; Aldaz *et al.*, 2002; Potapova *et al.*, 2002), evidenciando a alta eficiência da metodologia quando utilizado este sequenciador de última geração.

A estimativa da quantidade de genes reprimidos e ativados foi realizada por meio de algoritmo aperfeiçoado a partir do conjunto de softwares que acompanham o sequenciador SOLiD™. Os dados obtidos foram normalizados, e calculados os valores da concentração de tags e o nível de expressão gênica dentro de cada condição experimental (Bullard *et al.*, 2010; Robinson & Oshlack, 2010; Mastrokolias *et al.*, 2012). A partir dos resultados podemos perceber que apenas 5,99% dos genes mostraram níveis de expressão similares entre as duas condições, mostrando que boa parte dos genes sofrem alterações no nível de expressão durante a condição de hipóxia, seja reduzindo a expressão (51,24%), ou aumentando-a (42,77%).

Quando avaliada a categorização dos genes do tecido labial de *C. macropomum*, observamos uma distribuição similar entre as categorias para as duas condições experimentais, onde 41,17% dos genes analisados pertencem à categoria função molecular, 33,35% à categoria processo biológico e 25,48% à componente celular. Comparando estes resultados com o trabalho de Sousa (2009), onde foi feito o transcriptoma de hipófise e parte do tecido cerebral de tabaqui, é percebida uma diminuição de 21% na categoria função molecular e aumento nas categorias processo biológico (16%) e componente celular (8%), indicando a diferença funcional dos genes expressos entre os tecidos de *C. macropomum*.

Para descrever os mecanismos da expansão labial do tabaqui, foram selecionados no presente estudo 10 genes possivelmente envolvidos neste processo, a saber: HIF1A, ARNT, HIF1AN, VHL, VEGFC, VEGFR2, PLCG1, TRPC6, NOS1 e GUCY1A3, sendo que HIF1AN e VHL tiveram redução na expressão e VEGFC, VEGFR2, PLCG1, TRPC6, NOS1 e GUCY1A3 apresentaram aumento na expressão quando *C. macropomum* é exposto à hipóxia. Esta seleção de genes foi deduzida a partir da categorização gênica e do potencial envolvimento de suas proteínas/enzimas com o mecanismo de formação dos lábios do tabaqui, que serão discutidos a seguir.

5.3. Alterações fisiológicas reguladas pela expressão gênica

As adaptações fisiológicas à hipóxia dependem diretamente da regulação da expressão de genes específicos, fundamentais para os mecanismos pelos quais suas células respondem às baixas tensões de oxigênio. Os genes envolvidos nas respostas à hipóxia têm se destacado

entre os estudos recentes, como nos trabalhos de Küsher *et al.* (2006), Rytkonen *et al.* (2008), Liu *et al.* (2011) e Chen *et al.* (2012), devido ao crescente interesse biológico acerca do papel do oxigênio no desenvolvimento, na fisiologia e nas múltiplas patologias dos organismos. Estes processos são regulados por meio do recrutamento de fatores de transcrição específicos, sendo que seus produtos proteicos atuam na manutenção da homeostase dos organismos (revisto por Nikinmaa & Rees, 2005).

Dentre os fatores de transcrição mais estudados está o fator indutor de hipóxia 1 (HIF1), o principal responsável pela transcrição de genes em organismos expostos à hipóxia (revisto por Nikinmaa & Rees, 2005). O produto deste gene é responsável pela indução da expressão de inúmeros genes, entre os quais estão aqueles envolvidos na glicólise, eritropoiese, metabolismo de catecolaminas e angiogênese (revisto por Bracken *et al.*, 2003). O HIF1 é um heterodímero constituído por duas subunidades proteicas conhecidas como HIF1-alfa (HIF1A) e HIF1-beta (HIF1B ou ARNT), onde a subunidade HIF1A está diretamente relacionada com as respostas ligadas à hipóxia, enquanto a subunidade ARNT, não. Isto porque a subunidade ARNT, identificada como um receptor nuclear translocador de hidrocarbonetos arilo, pode se dimerizar a outros fatores de transcrição que não o HIF1A, entre eles o receptor de hidrocarboneto aril (AhR) durante a exposição a gentes xenobióticos (revisto por Bracken *et al.*, 2003; revisto por Nikinmaa & Rees, 2005).

A regulação da transcrição mediada pelo fator indutor de hipóxia é decorrente, principalmente, da quantidade da proteína HIF1A presente nas células. Esta proteína é produzida continuamente nos organismos, porém, em condições de normóxia, é rapidamente degradada. Este processo é mediado por um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD), onde resíduos conservados de prolina e asparagina específicos da proteína HIF1A são covalentemente modificados pela ação de enzimas hidroxilases (HIF1AN), permitindo o reconhecimento e ubiquitinação pela proteína von-Hippel-Lindau (VHL) e posterior degradação proteossômica da subunidade HIF1A. Por outro lado, em condições de hipóxia, a hidroxilação não ocorre, provocando o acúmulo e estabilização da proteína HIF1A, que segue para o núcleo celular, onde se dimeriza com o ARNT e se liga nas regiões promotoras dos genes de interesse (revisto por Bracken *et al.*, 2003; revisto por Nikinmaa & Rees, 2005).

Apesar de não existirem trabalhos referentes à expressão gênica relacionada ao tecido labial exposto à hipóxia, Nikinmaa & Rees (2005) sugerem que a expressão do gene HIF1A pode ocorrer em diferentes níveis e condições dependendo do tecido estudado. Tal informação serviu de base para propormos que no lábio de *C. macropomum* as respostas desencadeadas

pela hipóxia não são decorrentes do aumento da transcrição do gene HIF1A, como ocorre no fígado e gônadas de truta-arco-íris exposta a baixas tensões de oxigênio (Soitamo *et al.*, 2001), em células embrionárias em desenvolvimento de salmão (Vuori *et al.*, 2004) e no fígado de acará-açu submetido a hipóxia severa e aguda (Baptista, 2011). Sendo assim, no caso da expansão labial do tabaqui, é possível que haja outros fatores de transcrição substitutos, ou que ocorra uma maior estabilidade da proteína HIF1A, uma vez que, no presente trabalho, não houve diferença no nível de expressão de seu gene entre as condições de normóxia e hipóxia. Esta maior estabilidade da proteína HIF1A na condição de hipóxia é corroborada pela redução da expressão dos genes que possibilitam a sua degradação, são eles: HIF1AN (1,62 vezes) e VHL (1,32 vezes), cujos produtos proteicos promovem, respectivamente, a hidroxilação e ubiquitinação da subunidade HIF1A (bancos de dados UniProtKB e Swiss-Prot).

Como consequência do aumento da estabilidade da subunidade HIF1A, o heterodímero HIF1 é formado e passa a atuar como fator de transcrição, induzindo a ativação de genes como VEGFC (Schoppmann *et al.*, 2006). Este gene pertence à família dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs = VEGF ou VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE e fator de crescimento da placenta, conhecido como PIGF) e participa dos complexos processos de angiogênese linfática e do aumento da permeabilidade vascular (Cao *et al.*, 2004; revisito por Bates, 2010; Stewart, 2012).

É possível então que a expansão labial esteja relacionada com ajustes vasculares endoteliais, a exemplo do que ocorre com outros sistemas que apresentam esse tipo de fenômeno, envolvendo a expressão do gene do fator de crescimento vascular endotelial C (VEGFC). Em revisão, Bates (2010) mostra que uma vez ativado o VEGFC, ocorrem alterações rápidas e transientes na permeabilidade microvascular que duram de 2 a 3 minutos. Isto provoca um aumento da permeabilidade à água e solutos, principalmente albumina, em capilares, pós-capilares e vênulas, de modo a suprir a demanda imediata do organismo, retornando, em seguida, ao seu normal. Entretanto, quando a expressão do VEGFC, passa a ser prolongada, ocorre uma ampliação da duração do aumento da permeabilidade, aproximadamente, uma hora depois de sua ativação inicial, podendo durar dias. Com isso, podemos sugerir que quando iniciada a RSA pelo tabaqui, a ação do VEGFC é também iniciada, permanecendo expressa durante a condição de hipoxemia, expressando uma hora depois sinais visíveis do edema labial, decorrente do aumento da permeabilidade microvascular prolongada. Esse mecanismo poderá, em trabalhos futuros, ser esclarecido por

meio da cinética de expressão do gene em tela em diferentes tempos durante a exposição inicial do animal à hipóxia. Como a expansão dos lábios decorre, também, da exposição a outros fatores ambientais (Farias, 1992; Oliveira, 2003; Menezes, 2005; Kochhann, 2010), seria importante verificar se essas condições também levam a ampliação da expressão do VEGFC.

Isso nos permite supor que o aumento de 2,0 vezes na expressão do gene VEGFC nos animais expostos a condição de hipóxia no presente trabalho, poderia contribuir para a expansão do lábio do tabaqui, provocando um aumento prolongado da permeabilidade vascular, provocando o edema labial. Contudo, vale ressaltar que análises morfológicas anteriores não indicaram a existência de uma vascularização significativa com finalidade respiratória ou mesmo para a manutenção, por meio do aumento da pressão sanguínea, do lábio expandido do tabaqui durante períodos de hipóxia (Braum & Junk, 1982).

A ativação dos processos desencadeados pela proteína do gene VEGFC ocorre após a sua interação com receptores específicos das células. Sabe-se que cada proteína dos genes dos VEGFs possui seu receptor, entre os quais estão o VEGFR1, o VEGFR2 (denominado FLK1 em ratos e KDR em seres humanos) e o VEGFR3 (também conhecido como FLT4). É conhecido que a proteína VEGFA ativa os receptores VEGFR1 e VEGFR2, já a proteína VEGFC estimula o VEGFR2 e VEGFR3, enquanto a proteína PIGF age especificamente sobre o VEGFR1 (revisito por Bates, 2010). Uma observação importante acerca disso foi feita por Hillman *et al.* (2001), quando descreveram que o VEGFC, mas não PIGF, pode provocar um aumento agudo e crônico na permeabilidade à água de maneira semelhante ao VEGFA. Isto sugere que o VEGFA aumenta a permeabilidade por meio da estimulação do VEGFR2. Esta hipótese foi mais tarde corroborada por Whittles *et al.* (2002), após a inibição específica do receptor VEGFR2. Isto sugere que na formação do edema labial do tabaqui o receptor VEGFR2 pode estar atuando de forma mais ativa, o que é suportado a partir das análises de bioinformática que revelam um aumento da expressão do gene VEGFR2 (1,1 vezes).

Com a ativação do receptor VEGFR2 são iniciadas vias de sinalização posteriores, entre elas destacam-se: a via da fosfolipase C, gama 1 (PLCG1), a ativação de canais de entrada de cálcio (TRPC6), a síntese de óxido nítrico (NOS1) e o aumento na expressão da guanilato ciclase (GUCY1A3) (revisito por Bates, 2010). Dessa forma, presumimos que todas estas vias podem estar relacionadas ao mecanismo que leva à expansão labial do tabaqui, e para confirmação desta hipótese, a utilização de metodologias que promovem a regulação da expressão gênica pós transcricional será de grande valia. Para isso poderão ser utilizados, em

trabalhos futuros, pequenos RNAs de interferência (RNAsi-small interfering RNA) (Zhang *et al.*, 2012) que promovem a degradação de RNAs mensageiros específicos que servem de molde para a tradução das proteínas das vias acima citadas.

A proteína PLCG1 é conhecido por catalizar a produção de inositol 1,4,5 -trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) a partir de fosfoinositol 2-fosfato (PIP2) (bancos de dados UniProtKB e Swiss-Prot) e quando inibida, reduz a permeabilidade microvascular provocada por VEGFs (Pocock & Bates, 2001). Entre as proteínas catalizadas a partir da PLCG1, foi atribuída inicialmente à proteína IP3 a função de estimulação do aumento na permeabilidade microvascular provocada pelo VEGFA, uma vez que ela induz a liberação de cálcio das reservas intracelulares do retículo endoplasmático após se ligar aos receptores dos canais de cálcio. Isto foi observado por Bates & Curry (1997), que relataram que após a inibição dos canais de cálcio de vasos mesentéricos de sapos, há redução de aproximadamente cinco vezes na condutividade hidráulica mediada pelo VEGFA. Os autores concluíram que o aumento na condutividade hidráulica é decorrente do aumento da concentração de cálcio no citosol do endotélio dos microvasos. Entretanto, descobriu-se mais tarde que o aumento nessa condutividade hidráulica não estava relacionado com a liberação das reservas internas de cálcio, pois, com a inibição de IP3, o aumento da permeabilidade não era significativamente alterado (Pocock *et al.*, 2000). Foi sugerido, então, que o DAG era o responsável por ativar o aumento da permeabilidade, uma vez que a sua quebra pela enzima DAG lipase produz ácido aracdônico, que serve de substrato para a síntese de prostaglandina, uma proteína conhecida por mediar o aumento da permeabilidade microvascular. Também neste caso, após inibição da enzima DAG lipase, foi comprovado que também a prostaglandina não está envolvida neste processo, pois o aumento da condutividade hidráulica mediada pelo VEGFA continuou a existir (revisto por Bates, 2010). Sendo assim, Pocock & Bates (2001) sugeriram que o DAG atua diretamente no aumento da permeabilidade, uma vez que após a inibição da enzima DAG lipase foi percebido uma pequena elevação no aumento da permeabilidade, provavelmente decorrente do acúmulo do DAG no citosol. Essa hipótese foi confirmada por Pocock *et al.* (2004) após fornecerem evidências consistentes de que o VEGFA aumenta a condutividade hidráulica microvascular por meio da ação direta da DAG sobre os canais de cálcio TRPC, principalmente no canal TRPC-6 (revisto por Bates, 2010). Quando avaliada no presente estudo a expressão dos genes responsáveis por estes processos, foi observado um aumento na expressão gênica tanto da PLCG1 (1,1 vezes) quanto do TRPC6 (1,9 vezes), indicando que a expansão labial do *C. macropomum* pode estar diretamente relacionada ao aumento da

concentração de cálcio no citosol das células endoteliais. Assim, dado o modelo em tela (expansão do lábio) morfológicamente aparente, será possível analisar os níveis locais de cálcio, seja por meio da análise ultraestrutural ou por meio do uso de traçadores radioativos.

Uma vez estimulada a entrada de cálcio nas células endoteliais, o aumento da permeabilidade microvascular mediada por VEGFs ocorre com o desenvolvimento de vias transvasculares para o fluxo de fluidos e solutos. Tal processo é desencadeado pelo acúmulo de óxido nítrico (NO), que atua como sinalizador na ativação da enzima guanilato ciclase (processo comentado adiante). O NO é produzido a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que participa de forma direta neste processo de sinalização, pois, quando sua síntese é inibida, ocorre anulação do aumento da permeabilidade microvascular, tanto aguda como crônica, quando induzida por VEGFA e VEGFC (revisto por Bates, 2010). São descritas três isoformas de NOS em vertebrados, sendo uma induzida (iNOS ou NOS2) e duas constitutivas, a NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS3). A isoforma NOS1 está presente em diversas células e tecidos, entre os quais neurônios, células epiteliais, sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), músculo esquelético, órgão sexual masculino e células b do pâncreas. É cálcio-calmodulina dependente, ou seja, necessita de cálcio para sua ativação. Participa da transmissão sináptica no SNC, além de atuar na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação. Já a forma induzida (NOS2) não é regulada pelas concentrações de cálcio, sendo ativada por citocinas e lipopolissacarídeos no endotélio e na musculatura lisa vascular. A terceira e última isoforma, NOS3, produz óxido nítrico no endotélio vascular sob condições basais. É um potente inibidor de adesão e agregação de plaquetas à parede vascular e de leucócitos ao endotélio vascular. Além disso, ela inibe a síntese de DNA, a mitogênese e a proliferação de células da musculatura lisa vascular, sendo sua expressão significativamente suprimida pela hipóxia (Cerqueira & Yoshida, 2002). A partir da análise dos resultados do presente estudo, podemos afirmar que houve um aumento da expressão do gene NOS1 (1,2 vezes). Isto nos permite supor que, depois de traduzido o transcrito, a enzima NOS1 ainda inativa, passa por processos de ativação pós-traducionais, tendo como cofator os íons cálcio acumulados no meio intracelular, decorrentes da abertura dos canais TRPC6, possibilitando dessa forma a síntese de NO no tecido.

Como dito anteriormente, a relação entre o NO e a formação de vias transvasculares (fenestrações, lacunas transcelulares e organelas vesículo vacuolares) se dá por meio da sinalização e ativação da enzima guanilato ciclase. Quando ativada ela produz guanosina

monofosfato cíclica (GMPc) a partir de guanosina trifosfato (GTP), provocando o aumento das concentrações de GMPc no endotélio (revisto por Bates, 2010), como relatado por Meyer & Huxley (1992), Wu *et al.*(1996), Lakshminarayanan *et al.* (2000) e Morbidelli *et al.* (2010). Dentre as guanilato ciclases, existem dois grupos principais, as solúveis (sGC), receptoras para o óxido nítrico (NO), e as transmembranares (PGC), receptora para peptídeos natriuréticos. Na fisiologia do organismo as guanilato ciclases interferem na regulação da hiperplasia, na hipertrofia, na migração, na produção de matriz extracelular, na diferenciação celular e na progressão de tumores (banco de dados do GeneCards - The Human Gene Compendium). Neste trabalho encontramos um aumento na expressão do gene GUCY1A3 de 1,7 vezes. Esta guanilato ciclase pertence a classe das GC solúveis, receptoras de NO, suportando, portanto, o aumento da expressão encontrada no gene da NOS1, além da relação com a produção de matriz extracelular. Dessa forma, se encerra o processo de formação do lábio expandido do tabaqui em condições de hipóxia, tendo como etapa final a formação de vias transvasculares causadas pelo acúmulo de GMPc no endotélio, facilitando assim o extravasamento do plasma para a região intersticial.

Depois de descritos os genes possivelmente envolvidos no mecanismo de formação do edema labial na espécie *C. macropomum*, podemos propor que a via metabólica para a expressão deste fenótipo inicia-se com a estabilização da proteína HIF1A decorrente, possivelmente, da redução da expressão dos genes HIF1AN e VHL (Figura 17).

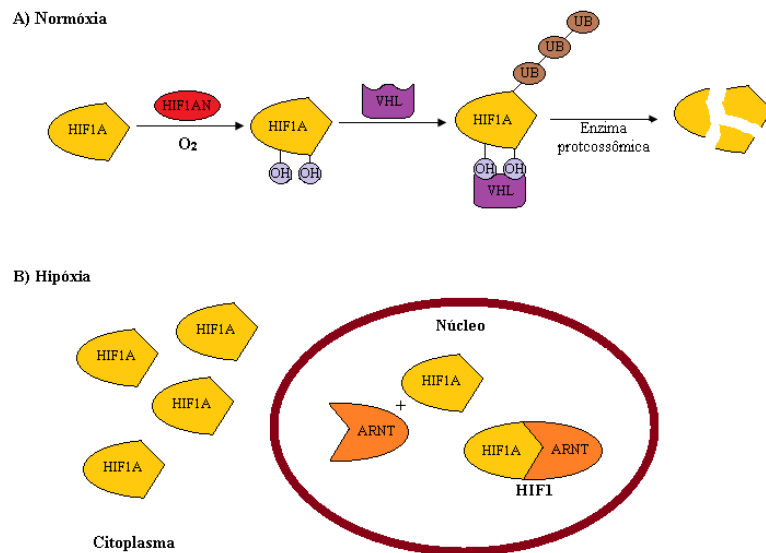


Figura 12 - (A) Em normóxia a subunidade HIF1A é hidroxilada pela enzima HIF1AN e ubiquitinada pela proteína VHL, possibilitando assim sua degradação proteossômica. (B) Em hipóxia, a subunidade HIF1A se dimeriza no núcleo com a subunidade ARNT, formando o fator de transcrição HIF1, que irá ativar a transcrição de genes específicos para manutenção da homeostase do organismo exposto às baixas tensões de oxigênio.

Em seguida, HIF1 se liga na região promotora do gene VEGFC estimulando sua transcrição. Depois de traduzido, o VEGFC é reconhecido pelo receptor VEGFR2 induzindo a síntese de DAG por meio da proteína PLCG1. A DAG promove a ativação dos canais catiônicos de membrana celular TRPC6, facilitando o influxo de íons cálcio do meio extra para o intracelular. Este aumento na concentração de cálcio intracelular ativa a enzima NOS1 que passa a sintetizar NO, que por sua vez, serve de cofator para a enzima GUCY1A3 catalizar a conversão de GTP em GMPc. O processo é finalizado com o aumento dos níveis de GMPc intracelular, induzindo a formação de vias transvasculares que facilitam o extravasamento do plasma para a região intersticial (Figura 18).

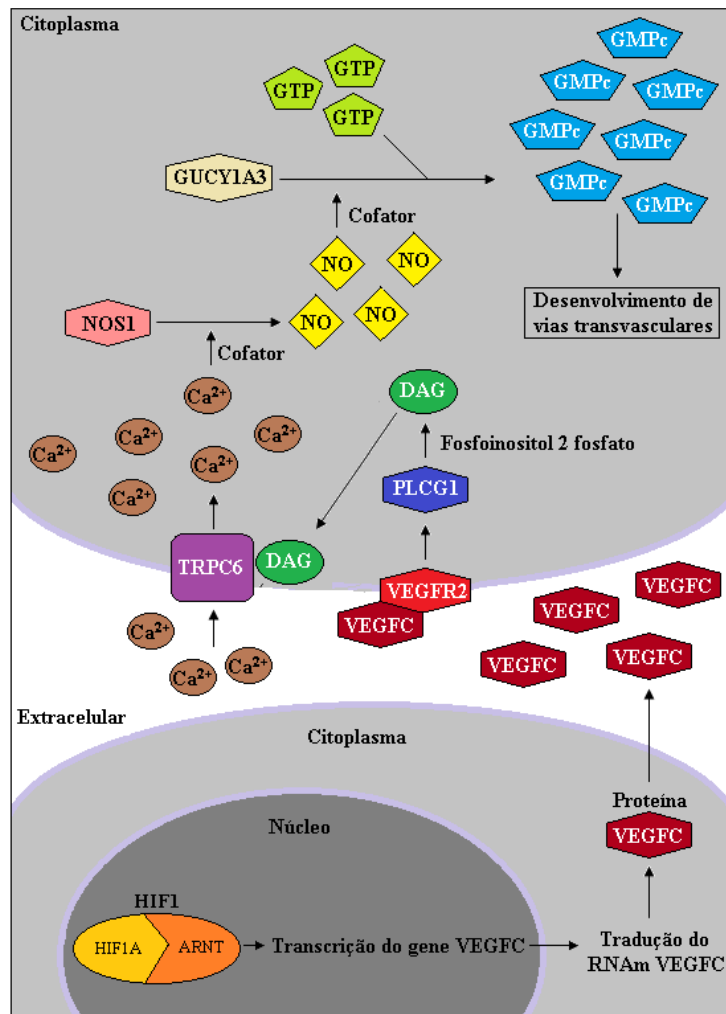


Figura 13 - Esquema ilustrativo da possível via metabólica que explica a formação do edema labial na espécie *Colossoma macropomum*.

6. Conclusões

- Entre os transcritos analisados, os genes ARNT, HIF1AN, VHL, VEGFC, KDR, PLCG1, TRPC6, NOS1 e GUCY1A3, são apresentados como os possíveis responsáveis pela formação do edema labial na espécie *Colossoma macropomum*, sendo que os genes HIF1AN e VHL tiveram redução e os genes VEGFC, KDR, PLCG1, TRPC6, NOS1 e GUCY1A3 tiveram expressão aumentada quando *C. macropomum* é exposto às baixas tensões de oxigênio.
- De acordo com os genes selecionados podemos sugerir que a via metabólica, para a formação da expansão labial na espécie *Colossoma macropomum*, tem início com a ligação do fator de transcrição HIF1 na região promotora do gene VEGFC, estimulando sua transcrição. Depois de traduzida a proteína VEGFC, ela é reconhecida pelo receptor VEGFR2, induzindo a síntese de DAG por meio da proteína PLCG1. A DAG promove a ativação dos canais catiônicos de membrana celular TRPC6, que permitem o influxo de íons cálcio do meio extra para o intracelular. Estes íons cálcio acumulados no meio intracelular servem de cofator para ativação da enzima NOS1, que passa a sintetizar NO, o cofator da enzima GUCY1A3. Esta enzima tem a função de converter GTP em GMPc, favorecendo o aumento dos níveis intracelulares de GMPc nas células microvasculares. Este acúmulo de GMPc induz a formação de vias transvasculares que facilitam o extravasamento do plasma para a região intersticial, provocando um edema e a expressão do fenótipo em questão.

7. Perspectivas

Validar os genes sequenciados na Plataforma SOLiD™ a fim de confirmar os dados obtidos neste trabalho e inferir valores de confiança para a utilização das sequências de referência da espécie *D. rerio* na análise dos resultados do sequenciamento das *tags* de *C. macropomum*. Para isso sugere-se:

- Amplificar por meio da técnica 3' RACE os genes envolvidos na expansão labial do tambaqui, utilizando no desenho de *primers* 3' as sequências das *tags* selecionadas que foram obtidas no sequenciamento SOLiD™ SAGE™.
- Sequenciar este material amplificado de modo a recuperar fragmentos mais longos de cDNA para o alinhamento local em um banco de dados de sequências expressas, permitindo confirmar a identificação dos genes selecionados.
- Validar por meio de reações em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) a quantificação dos genes selecionados, utilizando para o desenho dos *primers* 5' e 3' as sequências de cDNA obtidas na etapa anterior.

Confirmar por meio de metodologia específica (ex: RNAs de interferência) se realmente os genes selecionados são os responsáveis pela formação do edema labial na espécie *C. macropomum*.

8. Referências

Adams, M.D.; Kelley, J.M.; Gocayne, J.D.; Dubnick, M.; Polymeropoulos, M.H.; Xiao, H.; Merrill, C.R.; Wu, A.; Olde, B.; Moreno, R.F.; Kerlavage, A.R.; McCombie, W.R.; Venter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing. Expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252 (5013): 1651-1656.

Almeida-Val, V.M.F.; Gomes, A.R.C.; Lopes, N.P. 2006. Metabolic and physiological adjustments to low Oxygen and high temperature in fish of the Amazon. *In: Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Farrell, A.P. (Eds.). Fish Physiology*. Vol. 21. Academic Press, London, p. 443–500.

Almeida-Val, V.M.F.; Hochachka, P.W. 1995. Chapter 3. Air-breathing fishes: Metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. *In: P.W., H.; T.P., M. (Eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 5. Elsevier, p. 45-55.

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Duncan, W.P.; Souza, F.C.A.; Paula-Silva, M.N.; Land, S. 2000. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes:Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry & Molecular Biology*, 125 (2): 219-226.

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-explored biological “goldmine”. *In: Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Van den Thillart, G. (Eds.). Surviving hypoxia: mechanisms of control versus adaptation*. CRC Press, Boca Raton, p. 435-445.

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Walker, I. 1999. Long- and short-term adaptation of amazon fishes to varying O₂-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. *In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.). Biology of Tropical Fishes*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, p. 185-206.

Araújo-Lima, C.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tabaqui, ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé. 186 pp.

Baptista, R.B. 2011. *O efeito da hipóxia sobre o metabolismo e a expressão dos genes HIF-1 α e VEGF do ciclídeo amazônico Astronotus ocellatus (Agassiz, 1831)*. Nível Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 57 pp.

Bates, D.O. 2010. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovascular Research*, 87 (2): 267-271.

Bates, D.O.; Curry, F.E. 1997. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 273 (2): H687-H694.

Bracken, C.P.; Whitelaw, M.L.; Peet, D.J. 2003. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60 (7): 1376-1393.

Braum, E.; Junk, W.J. 1982. Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 67 (6): 869-886.

Bullard, J.H.; Purdom, E.; Hansen, K.D.; Dudoit, S. 2010. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *Bmc Bioinformatics*, 11 (94): 1-13.

Cao, R.; Eriksson, A.; Kubo, H.; Alitalo, K.; Cao, Y.; Thyberg, J. 2004. Comparative Evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-Induced Angiogenesis, Lymphangiogenesis, Vascular Fenestrations, and Permeability. *Circulation Research*, 94 (5): 664-670.

Carvalho, M.C.d.C.G.d.; Silva, D.C.G.d. 2010. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, 40 (3): 735-744.

Carvalho, M.L. 1981. *Alimentação do tambaqui jovem (Colossoma macropomum) e sua relação com a comunidade zooplancônica do lago grande - Manaquiri, Solimões - AM.* Nível Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Fundação Universidade do Amazonas, Manaus. 91 pp.

Cerqueira, N.F.; Yoshida, W.B. 2002. Óxido nítrico - Revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*, 17 (6): 417-423.

Chen, Y.; Dawes, P.T.; Matthey, D.L. 2012. Polymorphism in the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene is associated with serum VEGF-A level and disease activity in rheumatoid arthritis: Differential effect of cigarette smoking. *Cytokine*, 58 (3): 390-397.

Coelho, E.B. 2004. Capítulo 1 - Mecanismos de formação de edemas. *Simpósio: Semiologia*. Vol. 37. Medicina, Ribeirão Preto, p. 189-198.

Delbon, M.C. 2006. *Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, Oreochromis niloticus.* Nível Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Centro de aquicultura da UNESP, Jaboticabal. 91 pp.

Esteves, F.A. 1988. *Fundamentos de limnologia.* Editora Interciência, Rio de Janeiro. 575 pp.

Farias, I.P. 1992. *Efeito da aclimação térmica sobre a lactato desidrogenase de Colossoma macropomum e Hoplosternum littorale.* Nível Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Fundação Universidade do Amazonas, Manaus. 72 pp.

Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S.; Santos, G.M. 1998. *Peixes comerciais do Amazonas: Região de Santarém, Pará.* IBAMA, Brasília. 211 pp.

Florindo, L.H.; Leite, C.A.C.; Kalinin, A.L.; Reid, S.G.; Milsom, W.K.; Rantin, F.T. 2006. The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 209 (9): 1709-1715.

Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest. Explorations in Amazonian Natural History*. University of California Press, Berkeley. 280 pp.

Gupta, P.K. 2008. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends in Biotechnology*, 26 (11): 602-611.

Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. C.R.C. Press, Boca Raton. 245 pp.
Hert, D.G.; Fredlake, C.P.; Barron, A.E. 2008. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*, 29 4618-4626.

Hill, D.P.; Davis, A.P.; Richardson, J.E.; Corradi, J.P.; Ringwald, M.; Eppig, J.T.; Blake, J.A. 2001. Strategies for biological annotation of mammalian systems: Implementing gene ontologies in mouse genome informatics. *Genomics*, 74 (1): 121-128.

Hillman, N.J.; Whittles, C.E.; Pocock, T.M.; Williams, B.; Bates, D.O. 2001. Differential Effects of Vascular Endothelial Growth Factor-C and Placental Growth Factor-1 on the Hydraulic Conductivity of Frog Mesenteric Capillaries. *Journal of Vascular Research*, 38 (2): 176-186.

Junk, W.J.; Bayley, P.B.; Sparks, R.E. 1989. The flood-pulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge, D. (Ed.) *Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. 106. p. 110-127.

Keime, C.; Damiola, F.; Mouchiroud, D.; Duret, L.; Gandrillon, O. 2004. Identitag, a relational database for SAGE tag identification and interspecies comparison of SAGE libraries. *Bmc Bioinformatics*, 5 1-12.

Kochhann, D. 2010. *Exposição do tabaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e comportamentais*. Nível Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 63 pp.

Kramer, D.L.; McClure, M. 1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical fresh-water fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 7 (1): 47-55.

Küchler, A.M.; Gjini, E.; Peterson-Maduro, J.; Cancilla, B.; Wolburg, H.; Schulte-Merker, S. 2006. Development of the Zebrafish Lymphatic System Requires Vegfc Signaling. *Current Biology*, 16 (12): 1244-1248.

Lakshminarayanan, S.; Antonetti, D.A.; Gardner, T.W.; Tarbell, J.M. 2000. Effect of VEGF on Retinal Microvascular Endothelial Hydraulic Conductivity: The Role of NO. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41 (13): 4256-4261.

Lewis, W.M. 1970. Morphological adaptations of cyprino-dontoids for inhabiting oxygen deficient waters. *Copeia*, 319-326.

Lichtenfels, A.J.F.C.; Lorenzi-Filho, G.; Guimarães, E.T.; Macchione, M.; Saldiva, P.H.N. 1996. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. *Journal of Comparative Pathology*, 115 47-60.

Liu, X.; Du, J.; Xi, Q. 2011. HIF-1 alpha ODD polypeptides increased the expression of HIF1 and VEGF in hypoxic rat cortical neuron. *Neurological Sciences*, 32 (6): 1029-1033.

Mardis, E.R. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9 387-402.

Mastrokolas, A.; Dunnen, J.T.d.; Ommen, G.B.v.; Hoen, P.A.t.; Roon-Mom, W.M.v. 2012. Increased sensitivity of next generation sequencing-based expression profiling after globin reduction in human blood RNA. *Bmc Bioinformatics*, 13 (28): 1-9.

Matsumura, H.; Ito, A.; Saitoh, H.; Winter, P.; Kahl, G.; Reuter, M.; Kruger, D.H.; Terauchi, R. 2005. SuperSAGE. *Cellular Microbiology*, 7 (1): 11-18.

Matsumura, H.; Reich, S.; Ito, A.; Saitoh, H.; Kamoun, S.; Winter, P.; Kahl, G.; Reuter, M.; Kruger, D.H.; Terauchi, R. 2003. Gene expression analysis of plant host-pathogen

interactions by SuperSAGE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (26): 15718-15723.

McDonald, D.G.; Wood, C.M. 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin, J.C.; Jensen, F.B. (Eds.). *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, p. 297-321.

Menezes, A.C.L. 2005. *Toxicidade do cobre sobre tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8*. Nível Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 68 pp.

Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews*, 11 31-46.

Meyer, D.; Huxley, V. 1992. Capillary hydraulic conductivity is elevated by cGMP-dependent vasodilators. *Circulation Research*, 70 (2): 382-391.

Mirande, J.M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei:Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8 (3): 385-568.

Morbidelli, L.; Pyriochou, A.; Filippi, S.; Vasileiadis, I.; Roussos, C.; Zhou, Z.; Loutrari, H.; Waltenberger, J.; Stössel, A.; Giannis, A.; Ziche, M.; Papapetropoulos, A. 2010. The soluble guanylyl cyclase inhibitor NS-2028 reduces vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and permeability. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298 (3): R824-R832.

Morozova, O.; Marra, M.A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92 255-264.

Nikinmaa, M.; Rees, B.B. 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288 (5): R1079-R1090.

Oliveira, C.P.F. 2003. *Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tambaqui, Collossoma macropomum (Cuvier, 1818)*. Nível Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 70 pp.

Pearce, S.C.; Hudlická, O.; Brown, M.D. 2000. Effect of indomethacin on capillary growth and microvasculature in chronically stimulated rat skeletal muscles. *The Journal of Physiology*, 526 (2): 435-443.

Pleasant, E.D.; Marra, M.A.; Jones, S.J.M. 2003. Assessment of SAGE in transcript identification. *Genome Research*, 13 (6): 1203-1215.

Pocock, T.M.; Bates, D.O. 2001. In vivo mechanisms of vascular endothelial growth factor-mediated increased hydraulic conductivity of Rana capillaries. *The Journal of Physiology*, 534 (2): 479-488.

Pocock, T.M.; Foster, R.R.; Bates, D.O. 2004. Evidence of a role for TRPC channels in VEGF-mediated increased vascular permeability in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 286 (3): H1015-H1026.

Pocock, T.M.; Williams, B.; Curry, F.E.; Bates, D.O. 2000. VEGF and ATP act by different mechanisms to increase microvascular permeability and endothelial [Ca²⁺]_i. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279 (4): H1625-H1634.

Rantin, F.T.; Guerra, C.D.; Kalinin, A.L.; Glass, M.L. 1998. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*, 119 (4): 991-997.

Robinson, M.D.; Oshlack, A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Bmc Bioinformatics*, 11 (R25): 2-9.

Ryo, A.; Kondoh, N.; Wakatsuki, T.; Hada, A.; Yamamoto, N.; Yamamoto, M. 2000. A modified serial analysis of gene expression that generates longer sequence tags by nonpalindromic cohesive linker ligation. *Analytical Biochemistry*, 277 (1): 160-162.

Rytkonen, K.T.; Ryynanen, H.J.; Nikinmaa, M.; Primmer, C.R. 2008. Variable patterns in the molecular evolution of the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) gene in teleost fishes and mammals. *Gene*, 420 (1): 1-10.

Saha, S.; Sparks, A.B.; Rago, C.; Akmaev, V.; Wang, C.J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W.; Velculescu, V.E. 2002. Using the transcriptome to annotate the genome. *Nature Biotechnology*, 20 (5): 508-512.

Saint-Paul, U. 1984. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical Characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminae. *Environmental Biology of Fishes*, 11 (1): 53-62.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12): 5463-5467.

Scarabotti, P.A.; Lopez, J.A.; Ghirardi, R.; Julieta Parma, M. 2011. Morphological plasticity associated with environmental hypoxia in characiform fishes from neotropical floodplain lakes. *Environmental Biology of Fishes*, 92 (3): 391-402.

Schoppmann, S.; Fenzl, A.; Schindl, M.; Bachleitner-Hofmann, T.; Nagy, K.; Gnant, M.; Horvat, R.; Jakesz, R.; Birner, P. 2006. Hypoxia inducible factor-1 α correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 99 (2): 135-141.

Silva, S.F. 1990. *Ácido láctico e a formação de lábios no tambaqui (Colossoma macropomum)*. Nível Monografia, Faculdade de Ciências Agrárias da Fundação Universidade do Amazonas, Manaus. 39 pp.

Sioli, H. 1984. *The Amazon and its main affluents: Hydrology, morphology of the rivers course, and river types*. Junk Publishers, Netherlands. 580 pp.

- Sioli, H. 1990. *Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Editora Vozes, Petrópolis. 73 pp.
- Soitamo, A.J.; Råbergh, C.M.I.; Gassmann, M.; Sistonen, L.; Nikinmaa, M. 2001. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1 α) from Rainbow Trout. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (23): 19699-19705.
- Sousa, A.R.B.d. 2009. *Análise do transcrito de etiquetas de seqüências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (Colossoma macropomum) e expressão do cDNA do hormônio de crescimento em Pichia pastoris*. Nível Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 65 pp.
- Stewart, M.W. 2012. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - Biochemistry and development of inhibitory drugs. *Current Drug Therapy*, 7 (2): 80-89.
- Sundin, L.; Reid, S.G.; Rantin, F.T.; Milsom, W.K. 2000. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Experimental Biology*, 203 (7): 1225-1239.
- Telles, G.P.; Braga, M.D.V.; Dias, Z.; Lin, T.L.; Qutizau, J.A.A.; Da Silva, F.R.; Meidanis, J. 2001. Bioinformatics of the sugarcane EST project. *Genetics and Molecular Biology*, 24 1-15.
- Val, A.L. 1986. *Hemoglobinas de Colossoma macropomum, Cuvier 1818 (Characoidei, pisces): aspectos adaptativos*. Nível Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico /Fundação Universidade do Amazonas, Manaus. 112 pp.
- Val, A.L. 1993. Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh water. In: Bicudo, J.E.P.W. (Ed.) *The vertebrate gas transport cascade. Adaptations to environment and mode of life*. CRC Press, Boca Raton, p. 43-53.
- Val, A.L. 1995. Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28 1119-1127.

Val, A.L. 1996. Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon. *In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.). Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon.* INPA, Manaus, p. 59-74.

Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their environments.* Springer Verlag, Heidelberg. 224 pp.

Val, A.L.; Paula-Silva, M.N.; Almeida-Val, V.M.F. 2004. Estresse em peixes – Ajustes Fisiológicos e Distúrbios Orgânicos. *In: Ranzan-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.d.l.A.P. (Eds.). Sanidade de Organismos Aquáticos.* Editora Varela, São Paulo, p. 75-88.

Velculescu, V.E.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science*, 270 (5235): 484-487.

Verheyen, E.; Blust, R.; Declair, W. 1994. Metabolic-rate, hypoxia tolerance and aquatic surface respiration of some lacustrine and riverine african cichlid fishes (Pisces, Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*, 107 (2): 403-411.

Vuori, K.A.M.; Soitamo, A.; Vuorinen, P.J.; Nikinmaa, M. 2004. Baltic salmon (*Salmo salar*) yolk-sac fry mortality is associated with disturbances in the function of hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 α) and consecutive gene expression. *Aquatic Toxicology*, 68 (4): 301-313.

Whittles, C.E.; Pocock, T.M.; Wedge, S.R.; Kendrew, J.; Hennequin, L.F.; Harper, S.J.; Bates, D.O. 2002. ZM323881, a Novel Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor-2 Tyrosine Kinase Activity. *Microcirculation*, 9 (6): 513-522.

Winemiller, K.O. 1989. Development of dermal lip protuberances for aquatic surface respiration south-american Characid fishes. *Copeia*, (2): 382-390.

Wu, H.M.; Huang, Q.; Yuan, Y.; Granger, H.J. 1996. VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 271 (6): H2735-H2739.

Xie, H.; Wasserman, A.; Levine, Z.; Novik, A.; Grebinskiy, V.; Shoshan, A.; Mintz, L. 2002. Large-Scale Protein Annotation through Gene Ontology. *Genome Research*, 12 (5): 785-794.

Yamamoto, M.; Wakatsuki, T.; Hada, A.; Ryo, A. 2001. Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. *Journal of Immunological Methods*, 250 (1-2): 45-66.

Yano, K.; Brown, L.F.; Detmar, M. 2001. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 104 (4): 409-417.

Zeng, S.; Gong, Z. 2002. Expressed sequence tags analysis of the expression profiles zebrafish testis and ovary. *Gene*, 294 45-53.

Zhang, H.; Yin, Y.; Zhang, L.; Zheng, X.; Gao, D.; Chen, K.; Zhang, Y. 2012. The effects of vascular endothelial growth factor C knockdown in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138 (1): 133-139.