

# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE MC1R EM FORMAS MELÂNICAS E NÃO MELÂNICAS DE LAGARTOS DO GÊNERO *AMEIVULA* (TEIIDAE, SQUAMATA)

Daniela Vuolo<sup>1</sup>; Bruno Fraga Moreira Xavier<sup>2</sup>; Rodrigo Marques Lima dos Santos<sup>3</sup>

Estudante do curso de Ciências Biológicas; danivuolo@gmail.com<sup>1</sup>

Estudante do curso de Ciências Biológicas; bfxavier@gmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade Mogi das Cruzes; santosrml@gmail.com<sup>3</sup>

Área do conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: *Ameivula*; melanismo; MC1R.

## INTRODUÇÃO

De modo geral, os organismos ectotérmicos podem aquecer-se, esfriar-se ou manter sua temperatura corpórea estável por diversas vias (POUGH, 2003) e, nos lagartos, o mecanismo de regulação térmica atinge um destacável grau de refinamento (BOGERT, 1949, 1959). Isso não significa que sua temperatura é a mesma do ambiente em que se encontram (ROCHA, 1994). Para manter sua temperatura corpórea dentro de uma faixa estreita favorável às suas funções metabólicas, os lagartos se termorregulam, isto é, controlam o ganho e a perda de calor corpóreo (ROCHA, 1994). Os lagartos do gênero *Ameivula* habitam diferentes formações vegetais do Brasil e apresentam uma ampla variação em sua coloração, que pode tanto influenciar a absorção de calor proveniente do sol como também estar associada a outros fatores, como criptismo e seleção sexual. Isso os torna um excelente objeto de estudo para a investigação da base genética envolvida na expressão do melanismo. A variedade na coloração dos animais tem relevância comportamental e ecológica, podendo preencher uma colocação adaptativa em alguns contextos. Análises e comparações desta diversidade, em laboratório e na natureza, são vitais para a compreensão de muitos processos biológicos em nível molecular, celular e do desenvolvimento. O pigmento mais explorado nos estudos de variação de coloração é a melanina, envolvida na proteção contra radiação UV, na camuflagem e, até mesmo, na seleção sexual (CORSO; HEPP, 2013). Dentre os genes atuantes na expressão fenotípica, destaca-se o gene MC1R ou MSH-R (*Melanocyte Stimulating Hormone Receptor*), relacionado com a produção de melanina nos melanócitos e envolvido com a expressão de formas fenotípicas melânicas e não melânicas de diversos vertebrados, como mamíferos, aves e répteis. Sendo assim, o gênero *Ameivula* auxilia na compreensão das bases genéticas e evolutivas envolvidas na expressão desses fenótipos essenciais em animais ectotérmicos e contribui para uma melhor avaliação da relação entre a coloração corporal, o processo de termorregulação e a distribuição geográfica. O MC1R é um gene de extrema importância para o estudo da genética da pigmentação, porque está presente em diversos grupos de organismos, o que torna possível a realização de análises genéticas comparativas, auxiliando no entendimento da regulação dos fenótipos, além de possibilitar a descoberta de novas interações deste gene com outras características genéticas (CORSO; HEPP, 2013).

## OBJETIVO

Caracterizar o gene MC1R em formas fenotípicas melânicas e não melânicas de lagartos brasileiros do gênero *Ameivula*.

## METODOLOGIA

As amostras de tecido analisadas neste trabalho foram obtidas em coletas realizadas em diversas localidades brasileiras, sob licença do IBAMA, e retiradas do banco de tecidos de vertebrados do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do Dr. Miguel T. Rodrigues. O DNA total foi extraído de amostras de fígado ou músculo, previamente preservadas em etanol 100% ou freezer, segundo técnica com acetato de amônio de Fetzner (1999). As sequências do gene MC1R foram realizadas com os *primers* MC1R F 220 5'-TACTACTTCATCTGCTGCCTGGC -3' e MC1R R 870 5'-GCATAAATGATGGGGTCCAC -3' (ROSENBLUM *et al.*, 2004), e amplificadas por *polymerase chain reaction* (PCR), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, temperatura de anelamento a 58°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos; e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2% e os fragmentos que apresentaram resultados foram purificados, adicionando-se Exonuclease (EXO) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). Estes produtos foram levados ao termociclador, onde eram mantidos durante 50 minutos a 37°C, seguidos de 15 minutos a 80°C. Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit *Perkin Elmer ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Esses produtos eram colocados em termociclador, com aquecimento inicial de 96°C por 30 segundos, seguido de 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por quatro minutos. As amostras finais foram armazenadas em freezer e, em seguida, precipitadas e sequenciadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer Biosystems/HITACHI). Os eletrofenogramas foram analisados no *software* CodonCode Aligner e a sequência consenso verificada no GenBank, através do BLAST. Logo após, as sequências foram editadas e alinhadas no *software* BioEdit e, finalmente, alinhadas no *software* Clustal Omega. Os desenhos das proteínas foram gerados no *software* Protter, através da sequência de aminoácidos gerada no BioEdit. Após o término do alinhamento das sequências geradas desse projeto, foi realizada análise e comparação dos resultados obtidos com o alinhamento dos trabalhos de Rosenblum *et al.*, (2009), e Corso & Freitas, (2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foi obtido sucesso na amplificação de 11 amostras, resultando em sequências de 460 pares de bases em média, com alguns sítios polimórficos identificados pelas letras “R” (Adenina ou Guanina) e “Y” (Citosina ou Timina) na sequência consenso: “AACCTCTTTATGCTCCTCTTGGARAATGGGGTGCTGGTGGTAGAGGGCA GCACACTGAGGCACATGGATAAYGTCATGGACATGCTCATATGCAGCTCT CTGATGTCTTCACTCTCTTTCCTGGGTGTATTGCTGTTGACCGCTACAT CACCATCTTCTATGCCCTGCGTTAYCACAGCATCATGACCATACARCGGG CTGTGGTCATCATCATGGTGGTCTGGRTTACCAGCAGCATCTCGAGCACT ATCTTCATTGCCTATGACAGTACAGCGGTCATYCTCTGCTTGGTGGTCTT CTTCTCTCCATGATCATCTTGATTGTGGCCCTCTACATCCAYATGTTCA CCTTGGCCTACCAGCATGCACGAAGRATCTCCGTCATGCAGAGGAAGCAR TCTTCCCCCARTTTCAGGAGCATGAAAGGGGCCATCACCTCACCATCTT GCTYGGAGTCTTCTTTGTCTGCTGGGGGCCYTTCTTCTCCACCTCATCC TCATCCTCATCTGTCCCTGARCGACCCACCTGTACCTGYTA”. O alinhamento de nucleotídeos apresentou um total de 136 transições distribuídas por 15 sítios (Quadro 1) e permitiu também a identificação de dois espécimes heterozigotos da espécie *A. abaetensis*. Com exceção da posição 376, as demais acontecem quase sempre da mesma

maneira para as mesmas amostras, mostrando proximidade filogenética entre alguns espécimes.

Posição	306	354	411	456	477	508	564	624	656	681	693	735	762	801	819	TOTAL
Consenso	R	Y	Y	Y	R	R	Y	Y	R	R	R	Y	Y	R	Y	
MTR 9974_F	G	C	Y	C	G	G	C	C	G	G	G	C	C	A	C	14
MRT 4636_R	G	C	T	C	G	A	C	C	G	G	G					11
MTR 9974_R	G	C	C	C	G	G	C	C	G	G	G	C	C	A	C	15
MTR 11231_R			C	C	G	G	C	C	A	G	G	C				10
MTR 11734_R			C	C	A	G	C	C	A	G	G					9
MTR 12569_F	G	C	C	T	G	G	C	C	A	G	G	C				12
ITA 1_R	G	T	C	T	G	G	T	C	A	A	A	T	C	G	T	15
ITB 3_F	A	Y	C	T	G	G	T	T	A	A	A	T	C			12
ABA 5_R			C	T	G	G	C	C	A	A	A	T				15
MTR 1_R	G	T	C	T	G	G	C	C	A	A	A	T	C	G	T	10
MTJ 12_R	G	T	C	T	G	G	C	C	A	A	A	T	T			13
																136

Apesar do número considerável de mutações observadas na sequência de nucleotídeos, o alinhamento de aminoácidos dos espécimes estudados neste trabalho apresentou apenas uma alteração, ou seja, houve apenas uma mutação não sinônima no espécime *Ameivula confusioniba* na posição 508 da sequência de nucleotídeos, onde há uma troca de guanina por adenosina, correspondente à posição 170 da sequência de aminoácidos, onde o apresentado pelos demais é valina, enquanto este espécime apresenta isoleucina. É uma mutação pontual, pois troca apenas um aminoácido por outro e ocorre na região transmembrânica da proteína. Uma mutação nessa região é relevante, pois mostra que pode haver alteração na expressão da proteína, devido à troca de aminoácido, enquanto uma mutação na região intracelular, por exemplo, pode não interferir no resultado final. Para analisar se essa mutação está ligada, diretamente, à expressão do fenótipo são necessários mais estudos com exemplares da mesma espécie e do mesmo gênero. Os demais exemplares estudados não apresentaram mutações não sinônimas, indicando assim que a troca de nucleotídeos não alterou a codificação de aminoácidos. Rosenblum *et al.*, (2009), e Corso & Freitas, (2011), expuseram que grande parte das mutações ocorridas no gene MC1R são sinônimas, ou seja, há troca de nucleotídeo em algum sítio do códon, mas não há substituição de aminoácidos em nenhum ponto. Na comparação dos resultados deste trabalho com os trabalhos de Rosenblum *et al* (2004; 2009) e Corso & Freitas (2011), a espécie mais semelhante ao gênero *Ameivula* é *Aspidoscelis inornata*. No alinhamento de nucleotídeos, foram observadas apenas 10 diferenças e no alinhamento de aminoácidos, consta apenas uma diferença na posição 222, onde *A. inornata* codifica o aminoácido isoleucina, enquanto os demais espécimes deste trabalho codificam valina.

## CONCLUSÃO

Assim como no trabalho de Corso & Freitas (2011), não foi possível comprovar, para este gênero, se a expressão do melanismo está relacionada, diretamente, com mutações no gene MC1R, indicando que outros genes e fatores (adaptação ao habitat, fisiologia, filogenia) podem estar associados à variação na coloração. Como em *A. inornata*, acredita-se que o fenótipo melânico é dominante no gênero *Ameivula*, porém mais estudos são necessários para corroborar essa informação, já que muitos espécimes não apresentam um fenótipo melânico. São necessárias mais investigações não só para o gene MC1R e sua relação com o fenótipo melânico em si, como, também, para outros genes que podem estar relacionados à pigmentação e, assim, à expressão fenotípica do animal. Apesar de muitas pesquisas e indagações, em répteis, pouco se conhece sobre a

relação genótipo/fenótipo para coloração. Muitos mecanismos, fatores e interações podem estar conexos com variação na coloração, evidenciando a complexidade do tema, o que instiga mais estudos na área e a busca de maneiras para esclarecer o alicerce genético e molecular da coloração neste grupo, para encontrar respostas fisiológicas, filogenéticas, entre outras.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BOGERT, C.M. How reptiles regulate their body temperature. *Scientific American*. 1959.

BOGERT, C.M. Thermoregulation in reptiles: a factor in evolution. *Evolution*. 1949.

CORSO, J.; FREITAS, T.R.O. Base genética do polimorfismo da coloração em espécies de *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae), uma análise do gene receptor de melanocortina-1 (MC1R). 2011.

CORSO, J.; HEPP, D. Um gene: O gene MC1R e a pigmentação dos animais. *Genética na Escola*. 2013.

FETZNER, J. Extracting high-quality DNA from shed reptiles skins: a simplified method. *Biotechniques*. 1999.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. A vida dos vertebrados. 3.ed. São Paulo: Atheneu editora. 2003.

ROCHA, C.F.D. Introdução à ecologia de lagartos brasileiros. *Herpetologia do Brasil*. 1994.

ROSENBLUM, E.B. *et al.* Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at white sands. *PNAS*. 2009.

ROSENBLUM, E.B.; HOEKSTRA, H.E.; NACHMAN, M.W. Adaptive reptile color variation and the evolution of the MC1R gene. *Evolution*. 2004.

#### **AGRADECIMENTOS**

Aos Professores Doutores Rodrigo M.L. dos Santos, Yatiyo Yassuda e Miguel T. Rodrigues; ao colaborador Bruno F.M. Xavier; à equipe do laboratório de Biologia Molecular da USP e ao Instituto de Biociências da USP. Por fim, à Universidade de Mogi das Cruzes e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida.