

Primers microssatélites validados em tilápia do nilo no gene da aromatase cerebral (Cyp19b)

RODRIGUES, M. D. N.^{1*}; TAVARES, R. A.²; ACOSTA, I. B.³; SILVA, J. C. Da⁴;
ALMEIDA, D. B.⁵; MOREIRA, C. G. Á.⁶; VERNETTI, C. H. M. M.⁷; MOREIRA H.
L. M.⁸

^{1*}Mestranda do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Bolsista Cnpq. Laboratório de Engenharia Genética Animal–LEGA/CENBIOT/UFPel Campus Universitário, s/nº. 96010-900 - Pelotas, RS. e-mail: nunes.mdnunes@gmail.com.

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Laboratório de Engenharia Genética Animal –LEGA/CENBIOT/UFPel Campus Universitário, s/nº. 96010-900 - Pelotas, RS. e-mail: rafaaldrighi@gmail.com.

³Bióloga, pesquisadora no Laboratório de Engenharia Genética Animal–LEGA/CENBIOT/UFPel Campus Universitário, s/nº. 96010-900 - Pelotas, RS.. e-mail: izanibonel@hotmail.com.

⁴Mestranda do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Laboratório de Engenharia Genética Animal –LEGA/CENBIOT/UFPel Campus Universitário, s/nº. 96010-900 - Pelotas, RS. e-mail: jana.ufpel@gmail.com.

⁵Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Laboratório de Engenharia Genética Animal –LEGA/CENBIOT/UFPel Campus Universitário, s/nº. 96010-900 - Pelotas, RS. e-mail: diones_almeida@yahoo.com.br.

⁶Doutorando do Programa de Genética e Biologia Molecular – UFRGS, Instituto de Biociências, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323 - Bloco III Porto Alegre-RS. e-mail: carlafarma@gmail.com.

⁷Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Laboratório de Engenharia Genética Animal – LEGA/CENBIOT/UFPel Campus Universitário, s/nº. 96010-900 - Pelotas, RS. e-mail: crisvernetti@uol.com.br.

⁸Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Coordenador do Laboratório de Engenharia Genética Animal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. e-mail: heden.luiz@gmail.com.

RESUMO

A aromatase citocromo P450 é uma enzima que é responsável por um passo chave na biossíntese de estrogênio que está ligado à reprodução. Esta enzima é um produto do gene *Cyp19* e catalisa a formação de estrogênio a partir de androgênio. O estrogênio é essencial para o desenvolvimento das gônadas e diversos processos fisiológicos, que vão desde o crescimento normal até o comportamento reprodutivo. Este estudo teve como objetivo a validação de primers para locus microssatélite presente na região regulatória do gene *Cyp19b* de *Oreochromis niloticus*. Trinta amostras de três linhagens: Chitralada e Supreme da larvicultura Aquabel e GIFT da Universidade Estadual de Maringá – PR foram analisadas. Após a extração de DNA as amostras foram submetidas a PCR utilizando os primers desenhados para flanquear a região microssatélite. Após a confirmação da amplificação as amostras foram submetidas à separação eletroforética no aparato Origins (Elchrom Scientific, USA) para identificação dos alelos. Foi verificada a existência um polimorfismo na região promotora de *Cyp19b* nas três linhagens. Observamos três alelos, variando entre 123 e 141 pb. Os primers para a

amplificação de microssatélite na região regulatória do gene *Cyp19b* foram eficientes e, portanto, seu uso para identificação de mutações nesta região pode ser empregada na análise típica de microssatélite. Estudos estão sendo conduzidos para correlacionar o efeito da temperatura com os alelos observados nos animais amostrados e a proporção de sexo resultante.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, polimorfismo, reversão sexual.

ABSTRACT

Microsatellite primers validated in aromatase gene (*cyp19b*) in the brain of Nile tilapia

Aromatase cytochrome P450 is an enzyme that is responsible for a key step in the biosynthesis of estrogens, which is linked to reproduction. This enzyme is a product of the gene *Cyp19* and catalyzes the formation of estrogen from androgen. Estrogen is essential for the development of the gonads and various other physiological processes, ranging from normal growth to reproductive behavior. This study aimed at validation of primers for microsatellite locus in the regulatory region of gene *Cyp19b* in *Oreochromis niloticus*. Thirty samples of three strains were analyzed: Chitralada and Supreme from larviculture Aquabel, and GIFT from the State University of Maringá (Paraná, Brazil). After extraction of DNA, the samples were subjected to PCR using primers designed to flank a microsatellite region. After confirmation of amplification, the samples were subjected to electrophoretic separation in the apparatus Origins (Elchrom Scientific, USA) to identify the alleles. A polymorphism in the regulatory region of *Cyp19b* was identified in the three strains. Three alleles, ranging from 123 to 141 bp, were observed. The primers for amplification of microsatellite in the regulatory region of gene *Cyp19b* were efficient and, therefore, they may be used for identification of mutations in this region in typical microsatellite analysis. Studies are being conducted to correlate the effect of temperature with the alleles observed in the animals sampled and the resulting sex ratio.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, polymorphism, sex reversal.

INTRODUÇÃO

O uso de hormônios para reversão sexual em tilápias é utilizado para eliminar ou minimizar a reprodução nos tanques e alcançar uma maior produção de peixes através do melhor crescimento dos machos, além de maior uniformização dos lotes. A técnica consiste na reversão de fêmeas para machos pelo uso de hormônios esteróides masculinizantes (TACHIBANA et al., 2004).

O uso de hormônios na produção animal vem sendo questionado em qualquer fase de criação, dosagem ou tempo de utilização dos animais destinados ao consumo humano (OLIVEIRA et al., 2008) e, embora a reversão sexual com o uso de hormônios esteróides seja o método direto mais difundido e utilizado, existe hoje uma tendência na utilização de técnicas indiretas e diretas que não utilizam estes compostos. A busca destas alternativas ocorre principalmente, devido à preocupação dos consumidores com os efeitos residuais dos hormônios esteróides no meio ambiente e com a saúde humana (OLIVEIRA et al., 2008).

Uma variedade de vias bioquímicas envolvendo muitas proteínas diferentes (por exemplo, fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, receptores e sistemas de segundo mensageiro, etc.) podem atuar no controle da diferenciação do sexo. Uma vez

que a temperatura pode influenciar drasticamente a estrutura e função de proteínas e outras macromoléculas - flutuações de temperatura podem alterar as vias de determinação do sexo e, conseqüentemente, alterar o desenvolvimento da diferenciação do sexo de machos e fêmeas. Neste contexto, alguns pesquisadores utilizaram a temperatura como método alternativo de reversão sexual ao tratamento hormonal (BARAS et al., 2000, 2001; WANG & TSAI, 2000; TSAI et al., 2003; AZAZA et al., 2008). Estudos sugerem que a resposta a reversão sexual (proporção macho:fêmea) com o uso da temperatura apresenta um controle genético (BARAS et al., 2001; TESSEMA et al., 2006; STELKENS, 2010). Contudo, este controle genético da reversão apresenta variação entre os animais de uma mesma população (WESSELS & HÖRSTGEN-SCHWARK, 2007). Em uma linhagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Lago Manzala, Egito) duas linhas de seleção, uma para alta e outra para baixa resposta a reversão por temperatura foram utilizadas para estimar a herdabilidade desta resposta. As herdabilidades obtidas para a linha alta e baixa foram 0,69 e 0,86 respectivamente (WESSELS & HÖRSTGEN-SCHWARK, 2007). Portanto, este trabalho demonstra que é possível alterar a proporção macho:fêmea através da temperatura.

Baseado nessas observações e na necessidade de atender a demanda do mercado, bem como melhorar os níveis de produção é importante identificar o(s) gene(s) envolvido(s) neste controle da resposta da reversão baseada na temperatura. Genes ligados à conversão de estrógenos a partir de andrógenos são candidatos a fazerem parte deste mecanismo de controle da reversão sexual e, portanto, passível de sofrerem efeitos da temperatura. Este indicativo baseia-se no fato que vários trabalhos confirmaram que o estrogênio é requerido para diferenciação dos ovários (KWON et al., 2000; Kobayashi et al., 2003), e, portanto, genes regulando a sua síntese estariam ligados a determinação e/ou diferenciação do sexo.

O complexo enzimático da aromatase é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos em vertebrados (WANG et al., 2010). Uma das principais enzimas desse complexo é a citocromo P450arom. Em tilápias existem duas variantes da enzima aromatase, produzidas pelos genes *Cyp19a* e *Cyp19b* (CHANG et al., 2005). Chang et al. (2005) demonstraram que havia diferenças nas sequências da região codificadora da enzima e também na região regulatória entre genes. A expressão gênica desta enzima está diretamente ligada à diferenciação sexual. Entretanto, não há nenhum estudo da variação genética nas regiões regulatórias das duas variantes gênicas da aromatase e de sua relação com características reprodutivas nas linhagens de tilápia em uso na aquicultura brasileira.

Baseado no exposto o objetivo deste estudo é verificar se há polimorfismo para um locus de microssatélite presente na região regulatória do gene *Cyp19b* em linhagens comerciais de tilápia do Nilo utilizadas na piscicultura brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 30 amostras de três linhagens: Chitralada e Supreme provenientes da Piscicultura Aquabel de Rolândia – Paraná e a Genetically Improved Farmed Tilápia (GIFT) obtida da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para a extração de DNA genômico de nadadeira foi utilizada a metodologia baseada no uso de Fenol Clorofórmio. A integridade do DNA foi checada em gel de agarose 1%, corado com *GelGreen* (Biotium, USA) e visualizado no transluminador *Dark Reader* sob luz branca (Clare Chemical, USA).

De acordo com a sequência depositada por Chang et al. (2005) no *GenBank* (“accession numbers”: AF472621), foram desenhados primers com o programa Vector

NTI 8.0 (Invitrogen, Carlsbad, USA) para um locus de microssatélite presente na região regulatória do gene da CYP19b de tilápia. A sequência dos primers obtidos foram: forward 5' ACCATAGATTGGGTGTGGGGA 3' e o primer reverse 5' ACAA GGAATACCCTGCCTGTGGT 3'.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, 2 pmoles de cada primer, 1X buffer de PCR [10mM Tris HCl (pH 9.0), 1,5 mM MgCl e 50 mM KCl], 200mM de cada dNTP e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, Harrington Court, Canadá). A reação sem a presença de DNA (negativo) foi utilizada em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Alemanha). Foi utilizada a seguinte programação para amplificação: um passo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 8 minutos. As amplificações foram checadas em gel de agarose a 1% corado com *GelGreen* (Biotium, USA). Após a confirmação da amplificação as amostras foram submetidas à separação eletroforética no aparelho *Origins* (Elchrom Scientific, USA) utilizando uma matriz *Spreadex® EL 600 Wide Mini S-2x25* para identificação de alelos seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Os géis foram analisados sob luz ultravioleta e fotografados digitalmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A checagem da amplificação utilizando os *primers* desenhados para a região regulatória, que flanqueia o microssatélite de interesse apresenta em torno de 135 pb (Figura 1).

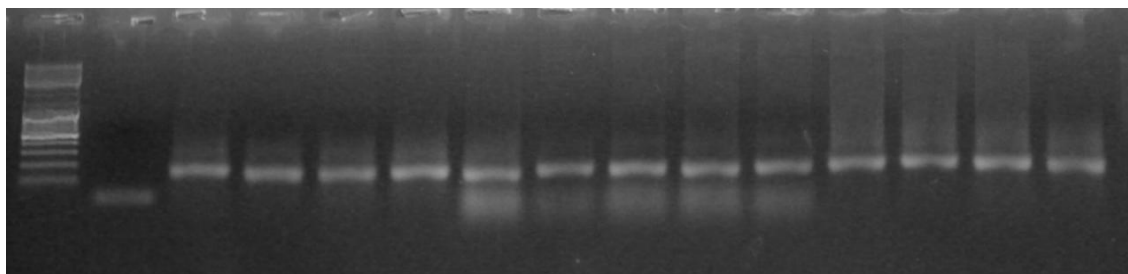


Figura 1. Checagem da amplificação para o locus microssatélites no gene CYP19b para amostras de tilápia de diferentes linhagens. Canaletas de 1 a 13 amostras de DNA de tilápia. N negativo e M marcador Generuler Ladder Mix (Fermentas). Gel de agarose 1% corado com Gelgreen e visualizado em luz UV.

Alguns estudos têm apontado que microssatélites presentes na região regulatória influenciam os níveis de expressão dos genes (Kocher e Streelman, 2002). Na figura 2 é demonstrando que existe um polimorfismo do tipo microssatélite nesta região regulatória do gene *Cyp19b*. O alelo A foi o mais frequente nestas linhagens e o alelo C foi encontrado somente na linhagem Supreme. Contudo, uma análise com um número maior de amostras deverá ser realizada para verificar se o alelo C é exclusivo da linhagem Supreme.

Amostras contendo os diferentes alelos foram reamplificadas nas condições descritas na metodologia e purificadas para realização do sequenciamento. Através do alinhamento das amostras sequenciadas com a sequência depositada por Chang et al. (2005) pode-se observar a presença do mesmo microssatélite, sendo que, a base

localizada na posição 823 do estudo em referência não se encontra presente no sequenciamento deste estudo (Figura 3). Além disso, pode-se observar que houve um encurtamento no microssatélite, em torno de 70 pb, explicando a diferença de tamanho entre o fragmento amplificado em relação ao esperado baseado na sequência depositada por Chang et al. (2005).

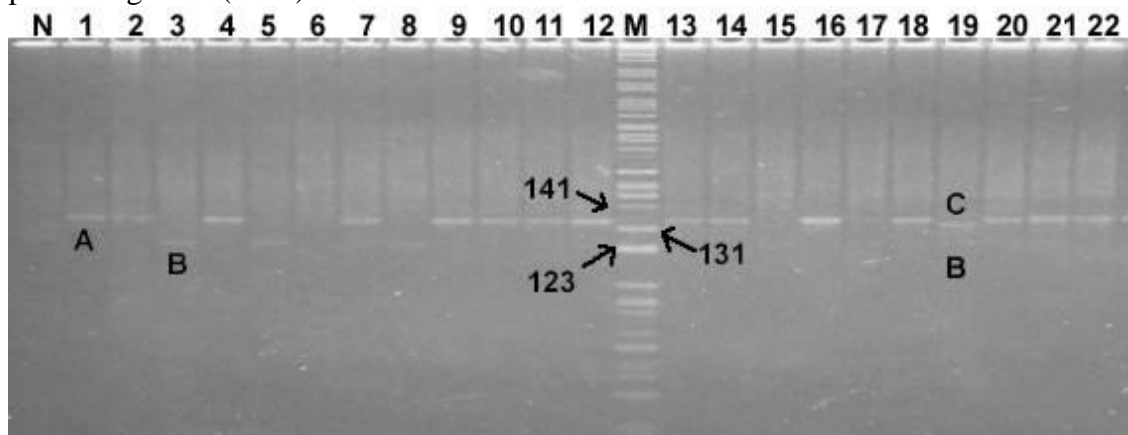


Figura 2. Amplificações de microssatélites presente na região promotora do gene *CYP19b* para amostras de tilápia em gel Spreadex® EL 600 Wide Mini S-2x25. 01 ao 07 = Linhagem Chitralada; 08 ao 14 = Linhagem GIFT; 15 ao 22 = Linhagem Supreme; N = controle negativo; M = marcador M3 marker; A, B e C = três diferentes alelos.



Figura 3. Alinhamento de seis sequências parciais do gene *Cyp19b* de tilápia com a sequência AF472621 depositada por Chang et al., (2005). A sequência consenso (em cores) demonstra que há a deleção de uma base Timina em relação a sequência AF472621.

Blazquez e Piferrer (2004) relataram que a expressão de *CYP19b* foi aumentada no cérebro dos machos de robalo após a diferenciação sexual (200 - 250 dias após a fecundação). Esses resultados sugerem que *CYP19b* está profundamente envolvida na diferenciação sexual da espécie, por isso um polimorfismo presente neste gene pode ser uma explicação genética para o processo de diferenciação sexual.

Alguns marcadores do tipo microssatélite ligados ao sexo têm sido identificados através de estudos de ligação genética em tilápia (LEE et al., 2004). Contudo, ainda não

se conhece a localização destes marcadores dentro do genoma. Portanto, uma dissecação de maior resolução é necessária para saber se estes marcadores estão presentes em genes atuando diretamente na determinação e/ou diferenciação do sexo, ou próximo de genes que realizam esta função. Diferentemente do trabalho de Lee et al. (2004), o polimorfismo de microssatélite observado neste estudo se encontra diretamente na região regulatória de um gene ligado a reprodução.

A utilização deste marcador em um experimento de reversão sexual permitirá avaliar se este polimorfismo presente nesta região do gene *Cyp19b* possui alguma relação com a variabilidade observada na resposta à reversão através da temperatura durante a fase de diferenciação sexual em tilápias.

CONCLUSÃO

Os primers desenhados para amplificação do microssatélite na região regulatória do gene *Cyp19b* foram eficientes. Portanto seu uso para identificação de mutações nesta região pode ser empregado na análise típica de microssatélite. Uma análise de qRT-PCR deverá ser realizada para observar o efeito deste polimorfismo sobre a expressão do gene e ver se essa interfere na reversão sexual baseada na temperatura.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de auxílio e financiamentos. Aos revisores anônimos pela enriquecimento do trabalho.

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas, nº de registro no CEEA: 1152.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, p 98–105, 2008.

BARAS, E.; PRIGNON, C.; GOHOUNGO, G.; MÉLARD, C. Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptative and evolutionary implications. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p 88–96, 2000.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed(XX – XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 92, p 187–199, 2001.

BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Pharmacology and Toxicology*, v. 130, p.399–409, 2001.

BLAZQUEZ, M.; PIFERRER, F. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 219, p. 83–94, 2004.

CHANG, X.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI-KAJURA, H.; SUDHAKUMARI, C. C.; NAGAHAMA, Y. Two types of aromatase with divergent encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, v. 141, p. 101–115, 2005.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenetic Genome Research*. v. 101, p.289–294, 2003.

KOCHER, T. D.; STREELMAN, J. T. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of saltchallenged tilapia. *Physiological Genomics*. v. 9, p.1–4, 2002.

KWON, J. Y.; HAGHPANAH, V.; KOGSON-HURTADO, L. M et al. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology*. v. 287, p.46–53, 2000.

LEE, B-Y; HULATA, G.; KOCHER, T. D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*, v. 92, p. 543–549, 2004.

OLIVEIRA, P. A. HEIN, G.; ALMEIDA, D. B.; COSTA, M. A. P.; MOREIRA, C. G.A. ; SILVA, J. C.; TAVARES, R. A.; TEIXEIRA, F.; MANZKE, V. H. B.; MOREIRA, H. L. M. . Avaliação da reversão sexual de alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) com o uso de vorozol em estufa. In: XVI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Pelotas. **Pesquisa e Responsabilidade Ambiental**. Pelotas : Editora e Gráfica Universitária, 2007.

STELKENS, R. B.; WEDEKIND, C. Environmental sex reversal, Trojan sex genes, and sex ratio adjustment: conditions and population consequences. *Molecular Ecology*. v.9, p. 627–646, 2010.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, p. 305–311, 2004.

TESSEMA, M.; MÜLLER-BELECKE, A.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Effect of rearing temperatures on the sex-ratios of *Oreochromis niloticus* populations. **Aquaculture**, v. 258, p. 270–277, 2006.

TSAI, C. L.; CHANG, S. L.; WANG, L. H.; CHAO, T. Y. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. **Journal Neuroendocrinology**, v. 15, p. 97–102, 2003.

WANG, D. S.; ZHOU, L. Y.; KOBAYASHI, T.; MATSUDA, M.; SHIBATA, Y.; SAKAI, F.; NAGAHAMA, Y. Doublesex-and Mab-3- Related Transcription Factor-1 Repression of Aromatase Transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1331–1340, 2010.

WANG, L. H.; TSAI, C. L. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 286, p 534–537, 2000.

WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. **Aquaculture**, v. 272, S1, p.S80–S87, 2007