

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE *CYP19A* EM *OREOCHROMIS NILOTICUS* DURANTE O PERÍODO DE INVERNAÇÃO EM REVERSÃO DE TEMPERATURA

DUARTE, Rodrigo T.¹; MUNDSTOCK, Cristina²; GUTIERREZ, Harold Julian Perez³; MOREIRA, Carla G. Ávila⁴; RODRIGUES, Márcia da Encarnação⁵ e

^{1,2}Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel; ³Zootecnista – Universidad de Santa Rosa de Caba/Colômbia; ⁴Doutoranda PPGBM – UFRGS; ⁵Programa de Pós Graduação em Zootecnia – UFPel. rodrigotduarte@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Segundo a FAO – 'Food and Agriculture Organization of United Nations' (2009), a produção de *Oreochromis niloticus* está amplamente distribuído pelo mundo, sendo cultivada e reproduzida em grande escala. A Tilápia é uma espécie exótica introduzida no Brasil, por esse hábito de criação apresenta 39% do total pescado proveniente da piscicultura continental (IBAMA 2009).

O fato de esta espécie alcançar a maturidade sexual muito cedo, geralmente entre o 4º ou 6º mês de vida acaba gerando problemas no cultivo (Kubitza, 2000) e competição por espaço (Arvalho e Foresti, 1996), causando uma redução da taxa de crescimento e depreciação da qualidade da produção.

Como estratégia de solução o problema de desperdício de machos apresenta taxa de crescimento reduzida (Arvalho et al., 2004), diversas técnicas foram implementadas com os monosssexuais masculinos. A mais utilizada para a reversão sexual é o uso de hormônios, porém bastante questionada quanto aos efeitos residuais, tanto para o meio ambiente quanto para saúde humana.

O processo de diferenciação sexual requer um avanço nas bioquímicas envolvidas no desenvolvimento de diferentes transcritos enzimáticos, receptores, sistemas de sinalização e (Nagahama, 2002), e como a temperatura pode influenciar grandemente na estrutura e função destas moléculas a reversão sexual pode ser induzida por vários meios que adotam o método hormonal (Wang e Tsai, 2000; Baras et al., 2001; Tsai et al., 2003; Azaza et al., 2008). Esses estudos fornecem evidências de que a temperatura afeta a diferenciação sexual feminina enquanto que a temperatura afeta a diferenciação sexual masculina.

O complexo enzimático aromatase é responsável pela conversão de andrógenos em estrogênio e é um produto do gene *CYP19a*, e é considerada como enzima chave para a diferenciação em peixes (Baroiller et al., 2009). Apesar deste conhecimento ainda não se sabe o mecanismo que regula esta expressão diferencial da aromatase em função da temperatura. Na maioria dos genes os elementos são controlados diretamente e por isso não há um regulador da expressão gênica a montante do gene *CYP19a* e de sua regulação característica reprodutivas nas linhagens de tilápia.

Baseado no exposto, o objetivo deste estudo foi investigar se há **polimorfismo** na região promotora da **CYP19a** durante o período de diferenciação sexual das linhagem Supreme.

2 METODOLOGIA

O experimento foi realizado nas instalações da Universidade Federal de Pelotas, no período de 15/04/2010 a 24/08/2010, com a participação de 93 larvas por unidade experimental.

Os animais foram obtidos da Piscicultura Aquabel em Rio Grande (RS). O tratamento com temperatura iniciou-se antes do período de desenvolvimento (dph). As larvas foram mantidas em aquários com aeração e iluminação de 12h/dia, providas de aquecimento e resfriamento. Os animais foram subdivididos em lotes de 93 larvas por unidade experimental. A exposição aos tratamentos ocorreu em tanques com temperatura de 25°C (T₂₅) e 35°C (T₃₅). A qualidade da água foi mantida por meio de filtros e sifonagem diária, sendo feita a renovação diária de 20% da água total. Os parâmetros físico-químicos da água foram avaliados e a mortalidade foi verificada diariamente através de observação direta e registros experimentais.

Foram obtidas amostras de amls de oost para análise do polimorfismo. Para extração de DNA, a metodologia com protocolo de Sidi e colaboradores (2005) foi utilizada. A qualidade do DNA foi checada em gel de agarose 1%, corado com GelGreen (Biotium, EUA) e visualizado no aparato Dark Reader sob luz branca (Clare Chemical, EUA). Os primers foram desenhados com o programa Vector NTI de acordo com a sequência do genoma (accession numbers: AF472620) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Chang et al., 2005). A sequência dos primers foi 5'-CACACGAGGTTACGCACACT-3' e na outra extremidade o primer reverse 5'-CCCATGCTGTCTGCTCTTGA-3'.

Para caracterizar o genótipo da ocorrência de variação no gene CYP19a, utilizou-se a técnica de PCR. A reação em cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 1 µl de genômero, 2 primers de cada primer, 1 X Taq buffer (pH 9.0), 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl, 200 mM de cada dNTP e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, USA). A reação sem presença de DNA foi utilizada para confirmar a ausência de contaminação. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemanha). Foi utilizada a seguinte programação: um passo inicial de 95°C por 3 minutos, desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As amplificações foram checad as em gel de agarose 1% corado com GelGreen (Biotium USA). Após a confirmação da amplificação, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida (PAGE) sob luz ultravioleta e fotografados digitalmente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de mortalidade apresentada pelos tratamentos foi de 15,4% e 7,6% respectivamente, variando dentro do esperado, condizendo com

dados encontrados em outros trabalhos (Borges et al., 2005), onde qualquer diferença pode ser devida a

Tchoudakova et al., 2001 e Galay-Burgos et al., 2006 detectaram um polimorfismo no promotor de *CYP19a* em peixes, mas nenhuma correlação com características reprodutivas foi encontrada. Contudo, foram encontradas variantes no promotor do gene *CYP19a* de *Japanese flounder* sugerindo que este polimorfismo pode estar alterando os processos reprodutivos desta espécie (He et al., 2009).

Conforme apresentado na Fig. 1 não foi observado padrões de bandas distintos durante o período de diferenciação sexual em filipia. A ausência de polimorfismo pode ser devida à linhagem, pois estes são indivíduos provenientes de linhagens relacionadas a processos reprodutivos.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Figura 1 - Gel de Poliacrilamida 10% - SSQ. Análise do padrão de bandas da região regulatória do gene *CYP19a* de *Oreochromis niloticus*. Canaletas: 1 (tempo zero), 2 e 3 (7 dias de tratamento à 25 e 30°C, respectivamente), 4 e 5 (14 dias, respectivamente), 6 (regativo), 7 e 8 (21 dias de tratamento à 25 e 30°C, respectivamente) e 9 (marcador GeneRuler DNA Ladder Mix).

Embora as evidências indiquem que o polimorfismo encontrado do gene da aromatase na linhagem Supreme não está relacionado com temperatura, variações em outras regiões do gene, e outros sites de ligação de fatores de transcrição podem estar diretamente ligados à reversão do sexo (He et al., 2009).

4 CONCLUSÃO

Não foi encontrado o polimorfismo no intervalo da região regulatória do gene *CYP19a* na linhagem Supreme analisada durante o período de diferenciação, podendo-se supor que esta porção do promotor analisado não deve estar relacionada à reversão sexual.

5 REFERÊNCIAS

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

BARAŞ E.; JACOBS B.; MARD, C. Effect of water temperature on growth and phenotypic sex of mixed (XX–XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, **Aquaculture**, v. 192, p. 187–199, 2001.

BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H.; SAILLANT, E. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. **Sexual Development**, v. 3, p. 118–135, 2009.

BORGES, A. M., Moretti, J. O. C., McManus, C., Mariante, A. S. Produção o d e população monosssexo ma do de -do-nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 153-159, 2005.

CARVALHO E. D.; FORESTI, F. Reversã *Oreochromis niloticus*, induzida por 17-alfa-meil It est est est: proporção de se e gônad **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p. 249-262, 1996.

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

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191–364, 2002.

GALAY-BURGOS, M.; GEALY, C.; NAVARRO-MARTIN, L.; PIFERRER, F.; ZANUY, S.; SWEENEY, G.E. Cloning of the promoter from the gonadal aromatase gene of the European sea bass and identification of single nucleotide polymorphiss. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, vol. 145, n.1, p.47-53, 2006.

HE, F.; WEN, H.S.; DONG, S.L.; SHI, B.; CHEN, C.F.; WANG, L.S.; YAO, J.; MU, X.J.; ZHOU, Y.G. Polymorphisms within promoter of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) ovary cytochrome P450-c19 (CYP19a) gene associated with reproductive traits. **Fish Physiology Biochemtry**, vol. 35, n.3, p.333-340, 2009.

IBAMA Estatística de pesca 2007 Brasil: gan e s re g i
Brá i a 2 0 0 9 1 7 4 p

KUBITZA, F. **Tilápia: te no do gl anjamento na p od çã oc**. Junho a í :
F. Kubitza, 2000. 285p.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. Desempenho e d i f e r e n ç a s l i n h a
(*Oreochromis niloticus*) na fase de revesã **Acta Scientiarum**, v. 26, p. 305–311, 2004.

TCHOUDAKOVA, A; KISHIDA, M; WOOD, E.; CALLARD, G.V. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 78, p. 427- 439, 2001.

TAI, 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 of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 97–102, 2003.

WANG, L. H.; TAI, C. L. Temperature affects the development of central neurotransmitter systems of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Neuroscience Letters**, v. 285, p. 95-98, 2000.