

## ANÁLISE “*IN SILICO*” DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM GENES ENVOLVIDOS NA DETERMINAÇÃO SEXUAL DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

**BERING FRÓES, Cristian<sup>1</sup>; DUARTE, Rodrigo Teixeira<sup>2</sup>; GARCIA, Verônica Hammes<sup>2</sup>; DODE, Maria Eduarda Bicca<sup>2</sup>; MOREIRA, Heden Luiz Marques<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Desenvolvimento Tecnológico/UFPEL – Graduando em Biotecnologia <sup>2</sup>Instituto de Biologia – Laboratório de Engenharia Genética Animal <sup>3</sup>Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas froes.cristian@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

Tilápia é o nome em comum de cerca de 40 a 50 espécies de ciclídeos nativos da África e Oriente Médio. Estas são chamadas de “frango aquático” pela sua robustez e adaptabilidade, sendo atualmente cultivadas em mais de 100 países, inclusive no Continente americano. (COWARD et al.2001)

Em tilápias, o sexo é determinado por fatores genéticos (XX/XY), no entanto a temperatura também pode influenciar a diferenciação gonadal. Temperaturas elevadas, na ordem de 35°C, assim como tratamentos hormonais podem gerar machos funcionais se aplicadas antes ou durante a diferenciação sexual. (D’COTTA et al., 2001). A reversão sexual é de fundamental importância em função da necessidade de evitar problemas derivados dos gastos energéticos com a cópula e desova, excesso populacional nos viveiros e, além disso, nesta espécie, o macho apresenta maior crescimento comparado com a fêmea. (MEURER et al., 2005).

Vários genes (*CYP19*, *SOX9*, *SF1*, *ESR1*, *DMRT1*, *DAX1* e *FOXL2*) estão envolvidos na cascata de diferenciação sexual, sendo o passo regulador da via referente ao produto do gene *CYP19*, a enzima aromatase, que é a “enzima-chave” no processo de esteroidogênese. (Hinshelwood et al., 2001)

Além disso, existem evidências que a distribuição genômica de microssatélites pode ser relacionada com a organização da cromatina, recombinação e reparo do DNA. (MAIA et al., 2008). Portanto, a frequência dos mesmos pode estar relacionada com a eficácia da reversão sexual sob diferentes tratamentos. Outras características importantes desses marcadores são: reprodutibilidade, caráter multialélico, natureza codominante e abundância através de todo o genoma, além da capacidade de correlacioná-los com diversos fenótipos (MAIA et al., 2008).

O objetivo deste trabalho é encontrar loci contendo microssatélites (“SSRs”) que atuem como possíveis marcadores moleculares para a reversão sexual em tilápia, e estabelecer *primers* para as regiões flanqueadoras dos mesmos.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

No presente trabalho, foi realizada uma busca na base de dados de nucleotídeos (*GenBank*) do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) referente aos genes envolvidos na cascata de determinação sexual em *O. niloticus*.

Estas sequências foram salvas no formato FASTA e armazenadas em arquivo de texto. Logo após, estas foram submetidas ao programa “*SSRLocator*” (MAIA et al., 2008) para a localização e caracterização de regiões microssatélites.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microsatélites são pequenas sequências ubíquas, em torno de 2-6 (pb) organizadas em “*tandem*”. Podem ser encontrados em diferentes regiões dos genes, na sequência codificante, sequências não traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR) e introns. (MELO et al. 2008). Variações nas regiões SSR se originam, principalmente, a partir de erros no processo de replicação e ou reparo do DNA. Estes erros geram inserções ou deleções, resultando em regiões maiores ou menores, respectivamente. (TÓTH et al., 2000)

Tabela 1: Representa os genes da cascata de determinação sexual, respectivos microsatélites (motivo), início e fim (em termos de posição na sequência), interrupções (representado pelo hífen entre os motivos) e repetição dos mesmos.

GENE	MOTIVO/Nº de Repetições	1º Início (pb)	1º Fim (pb)	2º Início (pb)	2º Fim (pb)
SF1 <i>O.aureus</i> (mRNA)	(CCAGTA)/2	597	608		
SOX9	(CTC)/6 (GT)/6-(GT)/9 (CCCGAG)/2 (GCGAGG)/2 (CAG)/4 (CAG)/4-(GCGGGG)2 (A)/16	188 619 1274 1958 2576 2786 3104	205 630 1285 1969 2587 2797 3119	633     2858	650     2869
FOXL2 (mRNA)	(TCACCA)/2	928	939		
DAX1	(CCTC)/3 (ATGCAC)/2 (AAAC)/3 (AAATAA)/2 (GT)6-(TG)/6 (CAG)/6 (AGTGTG)/2 (AAAAC)3-(AC)/7 (TGAACA)/2 (AAG)/6 (A)12-(AAAC)/3- (AAAAGA)/2 (TG)/6	1021 1222 3374 3529 3663 3924 5247 7364 8637 8852 10625 10976	1032 1233 3385 3540 3674 3941 5258 7378 8648 8869 10636 10987	3690      7401   10668	3701      7414   10679
DMTR1 (mRNA)	Ausente				

Como resultado da análise “*in silico*”, foram encontrados microssatélites para todos os genes relativos a cascata de determinação sexual, porém nem todas as sequências eram relativas a Tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Estas não estavam disponíveis no *GenBank*, ou se apresentavam de forma parcial (apenas éxons do gene), enquanto que outras encontravam-se disponíveis apenas na forma do seu produto de transcrição (*DMTR1*, *FOXL2* e *SF1*).

As sequências não disponíveis para a Tilápia do Nilo são relativas ao gene *CYP19*, *ESR1*, *SOX9* e *SF1*, sendo as duas primeiras, ausentes no *GenBank* (para *O. niloticus* e ou espécies próximas) e as duas últimas pertencentes à *Oreochromis aureus*, uma espécie correlata com a capacidade de formar híbridos com *Oreochromis niloticus* (MELO et al. 2008).

É de vital importância a prospecção de marcadores microssatélites, tendo em vista a sua ubiquidade (presença tanto em eucariotos como procaríotos) e seu papel funcional: na organização da cromatina (e, portanto nos níveis de expressão gênica), na formação de estruturas secundárias do DNA (alças e “*loops*”, por ex.), na qualidade de “*hot-spots*” para a recombinação gênica e até mesmo interferindo na replicação do DNA. (LI et al.). Portanto, a análise de microssatélites pode levar ao melhor entendimento de como se comporta a via de determinação sexual em diferentes espécies.

#### 4 CONCLUSÃO

Foram encontrados loci contendo possíveis marcadores moleculares, para quase todos os genes, com exceção do gene *DMRT1*.

Mais estudos são necessários para determinar se os produtos da análise “*in silico*” podem ser utilizados como marcadores, já que nem todas as sequências analisadas pertenciam a *O. niloticus* ou se apresentam na forma do seu produto de transcrição, o que pode modificar substancialmente o resultado em relação a uma análise posterior por PCR.

#### 5 REFERÊNCIAS

B. Li, Q. Xia, C. Lu, Z. Zhou, and Z. Xiang, “Analysis on frequency and density of microsatellites in coding sequences of several eukaryotic genomes,” **Genomics Proteomics & Bioinformatics**, v.2, n.1, p. 24–31, 2004.

COWARD, Kevin; LITTLE, David C.: Culture of the 'aquatic chicken': present concerns and future prospects. **Biologist** (London), v. 48, p.12-16, 2001

D'COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y.; GOVOROUN, M.; BAROILLER, J.F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.265-276, 2001.

IYER, Ravi; PLUCIENNIK, Anna; ROSCHE, Willian; SINDEN, Richard; WELLS, Robert; DNA polymerase III proof reading mutants enhance the expansion and deletion of triplet repeat sequence in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.3 p. 2174-2184, 2000

JURKA J, Pethiyagoda C: Simple repetitive DNA sequences from Primates: Compilation and analysis. **Journal of Molecular Evolution**, v. 40, p.120-126, 1994.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. et al. Fontes protéicas suplementadas com aminoácidos e minerais para a tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.1, p.1-6, 2005.

MAIA, Luciano Carlos da; PALMIERI, Dario Abel; SOUZA, Velci Queiroz de; KOPP; Mauricio Marini, OLIVEIRA, Antonio Costa de; "SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation," **International Journal of Plant Genomics**, vol. 2008, Article ID 412696, 9 pages, 2008.

MELO, Daniela Chemim de; OLIVEIRA, Denise A.A; ARNO SEERIG, Daniel Cardoso de Carvalho Practical application of microsatellite markers in genetic characterization and identification of stocks of tilapia. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.220-224, 2008.

MORGANTE, Michele. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3 n.1, p.175-182, 1993.

MOREIRA, Angela Aparecida. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 42, n. 4, 2007.

TÓTH G, GÁSPÁRI Z, JURKA J: Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p. 967-981. 2000

LI, You-Chun; KOROL, Abraham B; FAHIMA, Tzion; BEILES, Avigdor; NEVO, Eviatar., Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453–2465. 2002