

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE SOX9 NA LINHAGEM CHITRALADA DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

PEREZ, Harold G.^{1,2}; RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes²; MOREIRA, Carla G. Ávila²; BASSI, Gabriela²; ALMEIDA, Diones Bender²; MOREIRA, Heden Luiz Marques³

¹ Zootecnista – Universidad de Santa Rosa de Cabal / Colômbia– hajupegu@gmail.com

² Laboratório de Engenharia Genética Animal, Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão s/nº, caixa postal 354, CEP: 96010-900, Pelotas, RS; ³ Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas heden.luiz@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da aquicultura mundial nos últimos 50 anos teve início principalmente a partir dos domínios de métodos de reprodução controlada de algumas espécies (BORGES et al., 2005). A espécie mais comum de tilápia é a *Oreochromis niloticus*, que consegue atingir o período reprodutivo com 30 a 50g (BALTAZAR, 2007). Esta característica para qualquer produção animal é importante, porém para essa espécie muitas vezes isso é indesejável. A alta prolificidade, acaba gerando superpopulação nos ambientes de cultivo causando uma redução da qualidade da água, do ganho de peso e alta mortalidade (KUBITZA, 2000). Para solucionar esse problema de superpopulação, existem diversas metodologias para a obtenção de populações monos-sexuais masculinas. Uma delas seria a utilização na ração do hormônio 17 metiltestorona além de testes com altas temperaturas, as quais vêm sendo bastante utilizadas durante a diferenciação sexual.

Os genes da diferenciação e determinação sexual são: *Dmr1*, *Amh*, *Sf1*, *Dax1*, *FoxL2*, *CYP19* e *Sox9* (RAYMOND et al., 2000; TEVOSIAN et al 2002). Os genes *Sox*, são determinantes do cromossoma Y e são necessários para o desenvolvimento dos testículos e da expressão do *Amh* nas células de Sertoli.

Em gônadas XX e XY de tilápias, os níveis de expressão do *Sox9* foram similares do 9º ao 29º dias pós fecundação (dpf), ficando mais forte logo em machos XY (IJIRI et al., 2008). Embora existam pesquisas dos genes envolvidos no processo de diferenciação e determinação sexual da tilápia, ainda não existem estudos da variação genética de alguns destes genes como o *Sox9*. O objetivo deste trabalho foi determinar se existe polimorfismo na região codificadora do gene *Sox9* na linhagem chitralada de tilápia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nas instalações da Universidade Federal de Pelotas no período de 28 de Março a 28 de Agosto de 2011. Os animais foram adquiridos da Piscicultura Aquabel, sendo utilizadas 1.500 larvas da chitralada, com 3 dias após da eclosão. As larvas foram mantidas em um sistema de recirculação fechada de água, temperatura controlada e aeração permanente.

Utilizaram-se 25 amostras dessa linhagem para análise de polimorfismo da região codificadora. Foi aplicada a técnica de PCR-SSCP (Ahmed et al., 2011). A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de nadadeiras, após foram lavadas com álcool, além de adicionar 550 µl tampão, 30 µl de SDS (20%), 7 µl de proteinase K (200 µg/ml). Todas as amostras foram incubadas a 50 °C, sendo

adicionado 550 µl de NaCl 5M e centrifugadas por 5 minutos à 12000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo com 900 µl de etanol absoluto. As amostras ficaram no freezer por 1 hora, depois foram lavadas com etanol 70%. Após foram adicionados 85 µl de TE e 5 µl de RNase (30 µg/ml) sendo as mesmas deixadas em banho-maria à 37 °C por 40 minutos. A qualidade do DNA foi determinada por meio de checagem em gel de agarose 1% e corados com *GelGreen* (Biotium). Os *primers* para o primeiro *intron* foram desenhados no programa Vector NTI 8.0 (Invitroen, USA) (WWW.ncbi.nlm.nih.gov) de acordo com as seqüências depositadas no GeneBank (EU373500, WWW.ncbi.nlm.nih.gov). A seqüências dos *primers* foram: SoxcodF: 5'GCTCAGCAAGACACTCGGAAA3' e Sox9codR 5'CGGGTGATCCTTCTTGTGC3'.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com volume final de 25 µl, nas seguintes proporções, água: 18,3 µl; Buffer Taq: 2,5 µl; MgCl₂: 1.5 µl; DNTP: 0.5 µl; SoxcodF: 0.5 µl; SoxcodR: 0.5 µl; Taq-polimerase: 0.2 µl; DNA: 1 µl. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient com uma etapa de desnaturação inicial 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60 °C por 50 segundos, 72 °C por 50 segundos e 72 °C por 10 minutos. Após os produtos de PCR foram diluídos em tampão contendo formamida e desnaturados a 95 °C por 10 minutos. A análise da variação genética foi realizada em gel de poliacrilamida 10% e observado no aparelho Dark Reader.

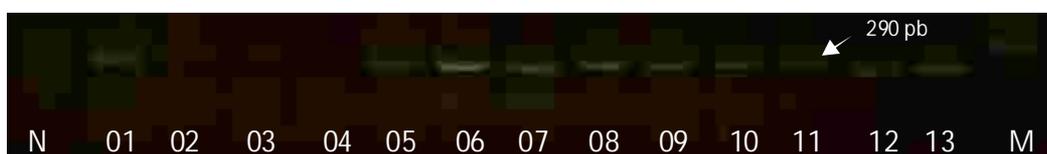
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este estudo está incluído em um trabalho de reversão sexual por temperatura, onde se espera encontrar variações nos genes da cascata hormonal na diferenciação sexual. Os resultados da reversão sexual ainda estão sendo avaliados.

O gene *Sox9* pertence à família dos genes *Sox*. O membro fundador da família dos genes *Sox* é o gene *SRY*. O *Sox9* é importante na formação das gônadas masculinas e tem sido observado que na maioria das vezes que ocorreu uma mudança parcial ou completa do sexo em humanos o *Sox9* estava envolvido (Hudson, 1983).

A expressão do gene *Sox9* foi previamente investigada e determinou-se que o gene está presente na cascata hormonal da diferenciação sexual, na qual apresentou um incremento na sua expressão a partir do dia 26 após da eclosão (TORRES et al., 2002).

A checagem em agarose dos produtos amplificados com os primers desenhados, a partir da sequência obtida no site www.ncbi.nlm.nih.gov de *O. aureus*, apresentou o tamanho esperado de 290 pb (Figura 1). A amplificação da região falqueada sendo de *O. aureus* foi possível Segundo Hacker (1995) porque o *Sox9* é um gene conservado, presente em todos os tipos de vertebrados. Em contraste o *Sry* é um gene mal conservado que parece ser exclusivo de mamíferos.



Análise da amplificação do gene *Sox9* em gel agarose 1%. Amostras da linhagem chitralada (*O. niloticus*). N negativo e M marcador Generuler DNA Ladder mix (Fermentas, Canadá).

A técnica de PCR-SSCP (Reaction-Single Stranded Conformational Polymorphism) foi utilizada para identificar a variação genética no gene *Sox9*. A partir dos produtos de PCR analisados, encontrou-se um polimorfismo na região flanqueada na qual tinha incluído o primeiro *Intron*. Foram observados três padrões na região flanqueada pelos primers utilizados (figura 2).

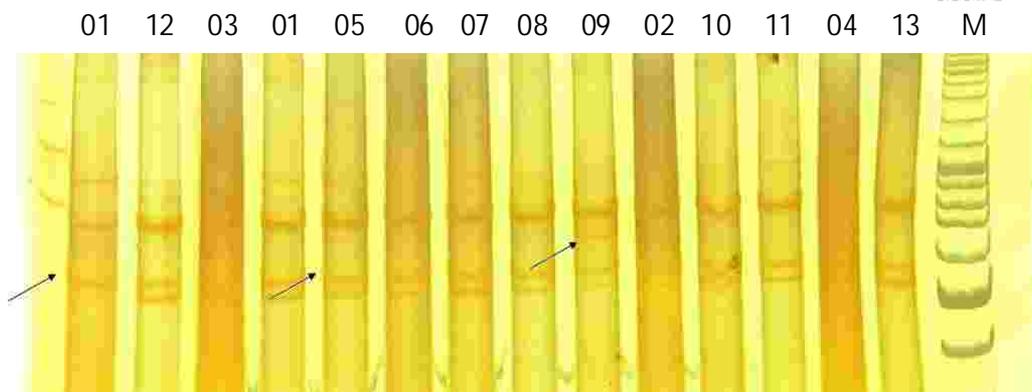


Figura 1 – Gel de poliacrilamida 10%. MARC: marcador de peso molecular Generuler DNA Ladder Mix (Fermentas®). Observa os três padrões de bandas encontrados na região flanqueada por os *primers* SoxcodF e SoxcodR.

O polimorfismo encontrado pode estar influenciado a resposta ao tratamento de reversão sexual por temperatura que tem sido observada em experimentos de diferenciação sexual. Contudo, dados de reversão e correlação com este polimorfismo ainda necessitam ser realizados.

Além é necessário seqüenciar o material amplificado por os primers SoxcodF e Sox9codR para determinar que tipo de mutação foi encontrada. A região flanqueada incluído o primeiro *intron* foi amplificada seguindo a lógica do que acontece em outros genes como o hormônio do crescimento (GH) da tilápia, que apresenta regulação da expressão no primeiro *intron* (ESTRADA, 2001).

4. CONCLUSÕES

Foi observado um polimorfismo na região flanqueada para os *primers* utilizados neste estudo, os quais estão localizados na região codificadora incluído o primeiro *Intron*. A partir deste resultado será realizada a análise do relacionamento deste polimorfismo com relação aos dados de reversão sexual.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED S.S; ABD EL EZIZ K.B; HASSAN N.A; MABROUK D.M. Genetic polymorphism of some genes related to reproductive traits and their association with calving interval in Egyptian buffalo. **Genomics and Quantitative Genetics**, v.3, p. 1 – 8, 2011.

BALTAZAR, Paúl M. La Tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. **Revista peruana de biología**, v.13, n. 3, p.267-273. 2007

BORGES, A. M., MORETTI, J. O. C., MCMANUS, C., MARIANTE, A. S. Produção de população monossexo macho de Tilapia-do-Nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v 40, p. 153-159, 2005.

ESTRADA, M. P; MARTINEZ R; GUILLEN I; PIMENTEL R; HERNANDEZ O; CRUZ A; ARENAL A; HERRERA M. T; MORALES R, **Tilapia chromosomal growth hormone gene expression accelerates growth in transgenic zebrafish (*Danio rerio*)**, Valparaiso, v.4, n.2, 2001.

HACKER, A.; CAPEL, B.; GOODFELLOW, P.; LOVELLBADGE, R. Expression of *Sry*, the mouse sex-determining gene. **Development**, v. 121, p. 1604-1614, 1995.

HOUSTON CS, OPITZ JM, SPRANGER JW, MACPHERSON RI, REED MH, GILBERT EF, HERRMANN J, SCHINZEL A. The campomelic syndrome: review, report of 17 cases and follow-up on the currently 17-year old boy first reported by Maroteaux et al. in 1971. **Am J Med Genet**, v. 15, p. 3–28, 1983.

IJIRI, S.; KANEKO, H.; KOBAYASHI, T.; WANG, D.; S.; SAKAI, F.; PAUL-PRASANTH, B.; NAKAMURA, M.; NAGAHAMA, Y. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 333–341, 2008.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 285p, 2000.

MALDONADO, T.L.C.; PIEDRA, A.L.; MENDOZA, M.N.; MARMOLEJO, A.V; MARTINEZ, M. A.; LARIOS M. H. Expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 20–26, 2002.

RAYMOND, C. S.; MURPHY, M. W.; O SULLIVAN, M. G.; BARDWELL, V. J.; ZARKOWER, D. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. **Genes & Development**, v. 14, p. 2587–2595, 2000.

TEVOSIAN, S. G.; ALBRECHT, K. H.; CRISPINO, J. D.; FUJIWARA, Y.; EICHER, E. M.; ORKIN, S. H. Gonadal differentiation, sex determination and normal *Sry* expression in mice require direct interaction between transcription partners *GATA4* and *FOG2*. **Development**, v. 129, p. 4627–4634, 2002.