CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *CYP-19* EM *Apareiodon* sp. (CHARACIFORMES: PARODONTIDAE)

Jeniffer Dias Aguiar (PIBIC/CNPq), Michelle Orane Schemberger (Pesquisadora), Viviane Nogaroto (Pesquisadora), Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), e-mail: vicarimr@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Ciências Biológicas/Genética/Genética Animal

Palavras-chave: Citogenômica, diferenciação gonadal, determinação sexual.

Resumo

A aromatase é codificada pelo gene *Cyp-19* e catalisa a fase final da biossíntese do estradiol e estrona. Em peixes são dois os genes de aromatase existentes, o *Cyp19a1a* expresso em gônadas, principalmente a feminina e, o *Cyp19a1b* que tem expressão cérebro específica. Algumas espécies de Parodontidae apresentam sistemas de cromossomos sexuais ZZ/ZW. *Apareiodon* sp. (ZZ/ZW) teve, recentemente, seu genoma sequenciado e montado. Com objetivo de caracterizar a estrutura molecular do gene *Cyp19* (aromatase) de *Apareiodon* sp., contigs contendo este gene foram recuperados do genoma. Buscas pelas fases abertas de leitura (ORFs) foram realizadas para obtenção da sequência polipeptídica e, após as análises retornaram similaridade à aromatase-like cerebral presente em peixes. A partir do alinhamento dessas sequências obtidas de macho e fêmea foi possível observar divergências na composição, que necessitam de confirmação quanto às diferenças genômicas relacionadas a determinação do sexo.

Introdução

Peixes apresentam uma enorme variedade de sistemas de cromossomos sexuais e especula-se sobre diferentes mecanismos de determinação do sexo (SCHEMBERGER et al., 2019). Estudos de determinação sexual em vertebrados mostraram marcadores ovarianos típicos (*FoxL2 – Forkhead Box L2; Rspo1 - R-spondin1* e; *Aromatase - Cyp19a*) e também marcadores testiculares típicos (*Sox-9 - Sry-Related Hmg-Box Gene 9* e *Dmrt-1 - Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1*), os quais são expressos em vias mutuamente exclusivas nas gônadas (UHLENHAUT et al., 2009).

Aromatase é o produto do gene *Cyp19*, um membro do P450 superfamília de enzimas do citocromo (CALLARD et al., 2001). O gene *Cyp19* humano é descrito apresentar uma única cópia no genoma e apresenta vários promotores e diferenças nos primeiros éxons tecidos específicos (CALLARD et al., 2001). Em Teleostei existem duas isoformas do gene da aromatase: *Cyp19a*, também denominado *Cyp19A1a* e o *Cyp19b,* também denominado *Cyp19A2* (LE PAGE et al., 2010). Expresso principalmente nas gônadas, o *Cyp19A1a* apresenta uma posição crucial para controlar não apenas a diferenciação ovariana, mas também a testicular em espécies de peixes gonocorísticos e hermafroditas (LE PAGE et al., 2010). Esta hipótese afirma que a regulação de *Cyp19A1a* é necessária não apenas para desencadear, mas também para manter a diferenciação ovariana, e que a atenuação da expressão *Cyp19A1a* é o único passo necessário para induzir uma via de diferenciação testicular (LE PAGE et al., 2010). Já o *Cyp19b* é expresso somente

no cérebro (LE PAGE et al., 2010). O *Cyp19b* atua com os primeiros hormônios gonadais para o estabelecimento de diferenças sexuais irreversíveis na organização dos circuitos neurais durante um período crítico de desenvolvimento (LE PAGE et al., 2010). Depois, os hormônios atuam sobre esses caminhos para modular a fisiologia e comportamento durante a vida adulta para alcançar uma reprodução bem-sucedida (LE PAGE et al., 2010).
Embora inúmeros sistemas de cromossomos sexuais tenham sido descritos, a determinação genética do sexo é pouco compreendida em peixes. Dados de sequenciamento de nova geração foram obtidos para *Apareiodon* sp. (ZZ/ZW) com objetivo de montagem dos genomas macho e fêmea e anotação da fração repetitiva que compõe a região específica do cromossomo W (SCHEMBERGER et al., 2019). Neste estudo, a caracterização da região codificadora do gene *Cyp-19* foi realizada de forma comparativa entre os dados genômicos de macho e fêmea de *Apareiodon* sp. para início da compreensão da atuação deste gene nas etapas da determinação do sexo em Parodontidae.

Material e Métodos
Gônadas de fêmeas de *Apareiodon* sp. foram submetidas à extração do RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA). Em paralelo, os dados genômicos de *Apareiodon* sp. foram utilizados para recuperar contigs que contém o gene *Cyp-19*. A partir da montagem do gene *Cyp-19* de *Astyanax mexicanus* e utilizando a regra GU/AG para início e fim dos íntrons foram identificadas as regiões exônicas do gene *Cyp-19,* para posterior alinhamento de sequências e desenho dos primers para a ORF. Os conjuntos de primers foram utilizados em reações de PCR padrão.
A ORF *Cyp-19* foi identificada com uso do programa FGENESH a partir do alinhamento com o genoma de referência de *A. mexicanus* e submetidas a tradução em sequências de aminoácidos no software Geneious 4.8.5. As sequências de aminoácidos foram então submetidas ao Blastx do NCBI e ao matching Pfam families para a identificação dos domínios proteicos. As sequências à montante e a jusante deste gene também foram alinhadas com as mesmas regiões genômicas de outras espécies de peixes na plataforma online Genomicus, para a identificação dos genes presentes no grupo de ligação.

Resultados e Discussão
Foram identificados contigs contendo *Cyp-19* nos genomas fêmea e macho de *Apareiodon* sp. Os contigs recuperados retornaram 94% de similaridade com o gene *brain aromatase-like* de *A. mexicanus* e *P. nattereri*. Na análise do grupo de ligação, na região *upstream* foi possível identificar o gene *cadherin-related* e, o gene *adaptor related protein complex 4 epsilon 1 subunit* (ap4e1) foi localizado *downstream* ao gene aromatase. Este mesmo grupo de ligação é observado nos genomas de *A. mexicanus* e *P. nattereri*. PCRs utilizando cDNA de gônadas femininas não retornaram os tamanhos de fragmentos esperados para o produto de amplificação da ORF do *Cyp-19* de *Apareiodon* sp. (dados não mostrados).
A predição da ORF mostrou que a aromatase em fêmea é constituída de 9 éxons e um total de 1476 nucleotídeos (Figura 1). Em macho a ORF possui 10 éxons e 1653 bases (Figura 2). Estas sequências apresentaram similaridade a aromatase-like de *P. nattereri* sendo, 90% em fêmea e, 88% em macho. O domínio proteico aromatase de fêmea foi visualizado para o segmento nucleotídico 130-1404 (Figura 1) e, em macho, corresponde ao segmento nucleotídico 130-1581 (Figura 2). A sequência predita da aromatase de *Apareiodon* sp. apresentou similaridade a aromatase-like

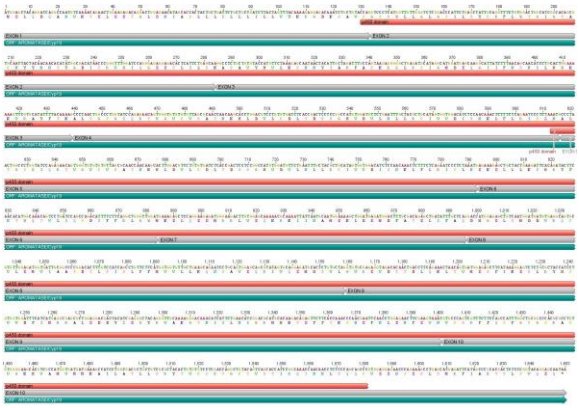
de *P. nattereri*, sendo 86% para fêmea e 91% para macho.

Figura 1. Sequência representativa do gene da aromatase obtida a partir dos dados genômicos de *Apareiodon* sp. (fêmea). A imagem demonstra a sequência nucleotídica, a sequência de aminoácidos, a delimitação do domínio proteico (vermelho), a divisão dos éxons (cinza) e a ORF completa (verde).



Downstream na cascata gênica de diferenciação do sexo feminino o gene *Cyp19* sintetiza a enzima aromatase, a qual medeia a conversão do androgênio para estrogênio em gônadas femininas (SANDRA; NORMA, 2010). A proporção destes dois hormônios é essencial para a diferenciação do ovário, sendo que suas quantidades são limitadas pela disponibilidade da aromatase (SANDRA; NORMA, 2010).

Figura 2. Sequência representativa do gene da aromatase obtida a partir dos dados genômicos de *Apareiodon* sp. (macho). A imagem demonstra a sequência nucleotídica, a sequência de aminoácidos, a delimitação do domínio proteico (vermelho), a divisão dos éxons (cinza) e a ORF completa (verde).



A partir do alinhamento das regiões genômicas foi possível observar uma diferença significativa na constituição das ORFs quando comparadas as sequências de macho e fêmea. A diferença consiste em uma deleção que resulta em um éxon a menos na ORF fêmea quando comparada a sequência de macho e de *A. mexicanus*. A presença do éxon a mais na sequência do macho gera dois domínios proteicos para aromatase. Já a ORF fêmea gera um único domínio aromatase. Embora prematuro para avaliar, as diferenças observadas para as sequências aromatase de macho e fêmea de *Apareiodon* sp. podem ser devidas as diferenças genômicas relacionadas a função desta enzima e determinação do sexo. Em outra via, este resultado pode ser decorrente de erros da montagem genômica devido a presença de dois genes muito similares (*Cyp-19a1a* e *Cyp-19a1b*) com função aromatase em peixes (SAWYER et al., 2006).

Os produtos de PCR com tamanho esperado não foram identificados com a amplificação utilizando cDNA gonadal. Este fato pode ser explicado devido a aromatase obtida de *Apareiodon* corresponder para a de função cerebral. Assim, nossa análise foi capaz de recuperar apenas uma provável cópia *Cyp19* similar ao gene de função cerebral, denominado de *Cyp19A1* em *A. mexicanus*. Essa confirmação se dá pela determinação do mesmo grupo de ligação entre *A. mexicanus* e *Apareiodon* sp., formado pela sequência *cdhr5b*, *Cyp19A1* e *ap4e1*. Por outro lado, em mamíferos o gene *Cyp19* não está duplicado e trabalha com inúmeros promotores e *splicing* alternativo para gerar isoformas proteicas (CALLARD et al., 2001). Nesse sentido, a análise da região promotora/reguladora do gene *Cyp19* presente no genoma de *Apareiodon* foi programada, bem como uma análise da ocorrência de *splicing* alternativo com a montagem dos transcriptomas.

Conclusão

Esse trabalho buscou determinar a estrutura do gene *Cyp19* em *Apareiodon* sp. A predição do gene *Cyp19* em *Apareiodon*, até o presente momento, não indica a ocorrência de duas cópias, uma com função gonadal e outra cerebral, como ocorre em outros peixes. A caracterização completa com sequenciamento sanger e a detecção de expressão gênica tecido específica podem auxiliar na compreensão da estrutura e função deste gene em Parodontidae.

Agradecimentos

Agradecemos ao Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA/ICMBio/SISBIO No. 15117); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico do Estado do Paraná (Fundação Araucária) e, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2015/16661-1).

Referências

CALLARD G.V; et al. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79, p. 305-314, 2001.

LE PAGE Y.; et al. Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 2105–2115, 2010.

SANDRA, G.; NORMA, M. Sexual determination and differentiation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 20, p. 101–121, 2010.

SAWYER, S.J.; GERSTNER, K.A.; CALLARD, G.V. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 108–117, 2006.

SCHEMBERGER, M. O.; et al. DNA transposons invasion and microsatellites accumulation guide the W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**, 2019. doi.org/10.1007/s00412-019-00721-9

UHLENHAUT, N.H.; et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. **Cell**, v. 139, p. 1130–1142, 2009.