



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IZABEL CORREA BANDEIRA

**Análise de genes parálogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e
seu receptor (GnRHR), envolvidos no processo reprodutivo do tambaqui**

Colossoma macropomum

Manaus – AM

2021

IZABEL CORREA BANDEIRA

Análise de genes parálogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR), envolvidos no processo reprodutivo do tabaqui

Colossoma macropomum

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito obrigatório para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Mota Buhrnheim

Co-orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Manaus – AM

2021

Ficha Catalográfica

B214a Bandeira, Izabel Correa

Análise de genes parálogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR), envolvidos no processo reprodutivo do tabaqui *Colossoma macropomum* / Izabel Correa Bandeira. Manaus: [s.n], 2021. 40 f.: color.; 8 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientador: Cristina Mota Buhrnheim Coorientador: Gilvan Ferreira da Silva

1. *Colossoma macropomum*. 2. Tabaqui. 3. GnRH. 4. Frameshift. I. Cristina Mota Buhrnheim (Orient.). II. Gilvan Ferreira da Silva (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Análise de genes parálogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR), envolvidos no processo reprodutivo do tabaqui *Colossoma macropomum*

IZABEL CORREA BANDEIRA

Análise de genes parálogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR), envolvidos no processo reprodutivo do tabaqui

Colossoma macropomum

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito obrigatório para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora

Dra. Ieda Hortêncio Batista
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Dra. Cristina Mota Buhrnheim
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Dra. Fernanda Loureiro Almeida O’Sullivan
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA

Conceito: Aprovado

Manaus, 12 de julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Fernanda O'Sullivan e Gilvan Ferreira pela orientação e oportunidade de crescimento profissional e principalmente aos meus amigos por todo incentivo e apoio, em especial a minha sensei T Vírus.

RESUMO

Os genes do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR) consistem na sinalização molecular mais utilizada pelo cérebro para regular a síntese e liberação de gonadotrofinas, sendo crucial na reprodução de muitos vertebrados. O tambaqui apresenta três genes parálogos para o GnRH (*cmgnrh1*, *cmgnrh2* e *cmgnrh3*) e seu receptor (*cmgnrhr1c*, *cmgnrhr1ca* e *cmgnrhr2b*), em que os genes ligantes codificam as formas sbGnRH, cGnRH-II e sGnRH. Os transcritos gonadais do gene *cmgnrh3* (sGnRH) apresentam frameshift com códon de parada prematuro. E, embora este fato indique um processo de pseudogenização, o gene exibe níveis elevados de transcrição em ovários que iniciam a puberdade e no bulbo olfatório de ambos os sexos (dados ainda não publicados), sugerindo um provável papel funcional a ser investigado, visto que, até então nenhum estudo elucidou para o tambaqui o comportamento do sistema GnRH em ambiente de cativeiro, informações que fundamentarão novas estratégias para a manipulação e melhoramento da desova nesta espécie.

Palavras-chaves: *Colossoma macropomum*; Tambaqui; GnRH; frameshift.

ABSTRACT

The *gonadotropin-releasing hormone* and *gonadotropin-releasing hormone receptor* genes are the most common molecular signal used by the brain to regulate gonadotropin synthesis, plays an important role in almost all vertebrates reproduction. The tambaqui showed three parallel lines of GnRH (*cmgnrh1*, *cmgnrh2* and *cmgnrh3*) and your receptor GnRHR (*cmgnrhr1c*, *cmgnrhr1ca* and *cmgnrhr2b*), wherein the three binders genes encoding the forms sbGnRH, cGnRH-II and sGnRH. Analysis with gonadal transcripts of the *cmgnrh3* gene (sGnRH) reveal a frameshift-like mutation, originating a premature stop codon at the beginning of exon2, which contains the information for the production of the sGnRH peptide. Despite this fact indicating a possible pseudogenization, the gene exhibits high levels of transcription in the olfactory bulb of males and females, presenting differentiated expression in ovaries at the beginning of puberty (data not yet published), suggesting a likely functional role to be investigated, whereas no study so far has analyzed the functioning of this system in the *Colossoma macropomum* species.

Keywords: *Colossoma macropomum*; Tambaqui; GnRH; frameshift.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema estrutural dos genes <i>cmgnrh1</i> e <i>cmgnrh2</i>	26
Figura 2	Esquema estrutural do gene <i>cmgnrh3</i>	26
Figura 3	Sequência de mRNA do gene <i>cmgnrh3</i> evidenciando o códon de parada prematuro no início do éxon 2.....	27
Figura 4	Esquema estrutural dos genes receptores <i>cmgnrhr1c</i> , <i>cmgnrhr1ca</i> e <i>cmgnrhr2b</i>	28
Figura 5	Alinhamento dos transcritos de preprognrh do tabaqui, destacando as regiões de primers Foward e Reverse para <i>cmgnrh1</i>	29
Figura 6	Alinhamento dos transcritos de preprognrh do tabaqui, destacando as regiões de primers Foward e Reverse para <i>cmgnrh2</i>	29
Figura 7	Alinhamento dos transcritos de preprognrh do tabaqui, destacando as regiões de primers Foward e Reverse para <i>cmgnrh3</i>	29
Figura 8	BLAST do sequenciamento evidenciando a especificidade para os primers de <i>cmgnrh1</i>	30
Figura 9	BLAST do sequenciamento evidenciando a especificidade para os primers de <i>cmgnrh3</i>	31
Figura 10	Gel de agarose 1,5% (m/v). Amplificação dos genes <i>cmgnrh1</i> , <i>cmgnrh3</i> e β -actina por reação de PCR a partir de cDNA e DNA genômico.....	31
Figura 11	Curva padrão da eficiência de amplificação dos primers para <i>cmgnrh1</i> , <i>cmgnrh2</i> e <i>cmgnrh3</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de aminoácidos das 8 variantes de GnRH identificadas em teleósteos	17
Tabela 2	Primers forward e reverse dos genes ligantes e receptores de GnRH para tambaqui	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1R	Primeira rodada de duplicação total do genoma
2R	Segunda rodada de duplicação total do genoma
3R	Terceira rodada de duplicação total do genoma
4R	Quarta rodada de duplicação total do genoma
aa	Aminoácido
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CDS	Coding Sequence / Sequência Codante
cGnRH-II	Chicken-II Gonadotropin-Releasing Hormone
<i>cmgnrh1</i>	<i>Colossoma macropomum gonadotropin releasing hormone 1</i>
<i>cmgnrh2</i>	<i>Colossoma macropomum gonadotropin releasing hormone 2</i>
<i>cmgnrh3</i>	<i>Colossoma macropomum gonadotropin releasing hormone 3</i>
<i>cmgnrhr1c</i>	<i>Colossoma macropomum gonadotropin releasing hormone receptor 1c</i>
<i>cmgnrhr1ca</i>	<i>Colossoma macropomum gonadotropin releasing hormone receptor 1ca</i>
<i>cmgnrhr2b</i>	<i>Colossoma macropomum gonadotropin releasing hormone receptor 2b</i>
CT	Cycle Threshold / Limiar do Ciclo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAP	GnRH Associated Peptide / Peptídeo associado ao GnRH
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone/ Hormônio Liberador de gonadotrofinas
GnRHR	GnRH Receptor / Receptor de GnRH
GTH-I	Gonadotropin I / Gonadotrofina I
GTH-II	Gonadotropin II / Gonadotrofina II
HHG	Hipotálamo-Hipófise-Gonadal

IDT	Integrated DNA Technologies
LH	Hormônio Luteinizante
MEGAX	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
min	Minuto
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
ORF	Open Reading Frames / Fase de Leitura Aberta
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	PCR de Transcrição Reversa Quantitativa
sbGnRH	Seabream-type GnRH
sGnRH	Salmon-type GnRH
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
Taq DNA Pol	Enzima DNA Polimerase Termoestável
Uniprot	Universal Protein (Banco de dados)
UTR	Untranslated region / Região não codante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Reprodução em peixes teleósteos: O eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal.....	14
2.2. Evolução do sistema GnRH em vertebrados	18
2.3. Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Geral:.....	21
3.2. Específicos:	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Identificação de sequências de genes do receptor gnrh e gnrh de tambaqui	21
4.2. Caracterização estrutural das proteínas GnRH's e GnRHR's de tambaqui	22
4.3. Construção de iniciadores ("primers") específicos e RT-qPCR	22
4.4. Coleta e amostragem	23
4.5. Análise histológica das gônadas.....	23
4.6. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Estrutura dos genes gnrh's do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	24
5.2. Estrutura dos genes receptores de GnRH do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) 28	
5.3. Construção de iniciadores específicos ("primers")	29
5.4. Ensaio de validação da eficiência dos primers em reações de RT-qPCR	31
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	33
8. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é o peixe mais produzido em cativeiro dentre as espécies nativas brasileiras que juntas somam 43,7% da produção nacional (IBGE, 2019). A produção comercial do tambaqui é favorecida por diversos fatores inerentes da espécie, como rápido crescimento, carne de grande aceitação e hábito alimentar diversificado, aceitando bem ração artificial e podendo ser criado em qualquer sistema de cultivo. Entretanto, por ser uma espécie migradora (de piracema), o tambaqui só reproduz mediante estímulos ambientais criados pela natação migratória que realiza durante o período reprodutivo (ZANIBONI-FILHO; BARBOSA, 1996). Dessa forma, quando cultivado em cativeiro, sua desova só é possível por meio da administração de hormônios específicos para induzir a maturação final e ovulação dos gametas.

A regulação endócrina da reprodução nos vertebrados consiste em uma rede coordenada de hormônios, atuando em diversos graus de complexidade e refletindo as especificidades de reprodução para cada espécie. Nesse processo, os órgãos, tipos celulares, hormônios e seus receptores constituem o eixo reprodutivo hipotálamo-hipófise-gônadas (YARON; LEVAVI-SIVAN, 2011). Nesse eixo, a síntese e liberação de gonadotrofinas pela hipófise depende de estímulos gerados pelo neuropeptídeo de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) que é produzido no hipotálamo e interage com seus receptores (GnRHR) presentes na membrana hipofisária.

As gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), são hormônios hipofisários que regem toda a maturação gonadal, ou seja, a produção de gametas e de esteróides gonadais (andrógenos, estrógenos e progesteronas). São eles, portanto, que regulam os processos reprodutivos como espermatogênese (nos machos) e crescimento folicular (nas fêmeas) em todos os vertebrados, incluindo os peixes. Por essa função reguladora, esses hormônios são empregados como indutores de desova em espécies reofílicas de peixes, sendo importantes para a produção de larvas, que são a base de toda a cadeia produtiva de espécies que possuem alta demanda de consumo, como o tambaqui.

A reprodução em cativeiro do tambaqui é realizada principalmente através da técnica de hipofisação, que consiste na aplicação de extratos hipofisários, ou seja,

as gonadotrofinas produzidas por um peixe são administradas em outro que não produz o suficiente por si mesmo, desencadeando os passos da sequência hormonal que conduz à maturação final/ovulação e espermição, sendo uma técnica bastante conhecida e praticada desde a década de 30 (ZANIBONI-FILHO; NUÑER, 2004). Na maioria das pisciculturas comerciais, incluindo a do tambaqui, a indução reprodutiva utiliza hipófises desidratadas de espécies de carpa, que são aplicadas na forma de extrato bruto, e diluídas em solução fisiológica (ANDRADE; YASUI, 2003).

O extrato bruto de hipófises de carpa é um produto altamente utilizado nas pisciculturas brasileiras pela facilidade de execução (MYLONAS et al, 2010; NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Entretanto, o uso de hipófise desidratada interespecies têm muitas desvantagens, sendo principalmente o alto risco de transmissão de doenças e a ausência de padronização na potência, pois cada hipófise possui quantidades diferentes de hormônios de outra de mesmo peso, uma vez que, a quantidade de gonadotrofinas contidas nessa glândula depende do grau de maturação do indivíduo em que foi coletada, sendo necessário que o peixe doador esteja em fase reprodutiva, em que os níveis de gonadotrofinas são suficientes para induzir a reprodução na espécie receptora, em termos práticos, isto significa que a hipófise a ser utilizada na indução reprodutiva não pode ser coletada em qualquer tempo, mas sim quando tiver armazenado gonadotrofinas suficiente. Outra desvantagem consiste no desenvolvimento de reações imunes a gonadotrofina exógena e/ou outras proteínas hormonais do extrato hipofisário nos peixes receptores (DONALDSON; HUNTER, 1983). Ademais, a sua utilização é proibida em algumas regiões do Brasil, sendo realizada apenas para fins de pesquisas (ANDRADE, 2012).

Atualmente, diversas pesquisas e produtos têm explorado o uso de outras substâncias indutoras da desova em peixes, em que os análogos de GnRH apresentam um grande potencial para manipulação de forma efetiva da reprodução dos vertebrados, em geral, a utilização desse neurohormônio apresenta diversas vantagens como a facilidade para a síntese desse peptídeo, eliminação de contaminações cruzadas e a estimulação da produção de gonadotrofinas endógenas (espécie-específica). Contudo, poucos produtos no mercado exploram os tipos de peptídeos de GnRH que possuem atuação hipofisiotrófica para peixes, e os que existem só exploram uma parcela das possibilidades, pois são produtos baseados na forma hipofisiotrófica de espécies exóticas, como o salmão.

Os atuais índices da piscicultura na economia brasileira mostram um cenário com boas perspectivas para o cultivo de peixes, em consequência ao crescente aumento na demanda de proteínas de carnes (PEIXE-BR, 2020), sendo necessário e urgente a produção de conhecimentos que fundamentem o desenvolvimento de tecnologias de produção dos peixes nativos do Brasil, visto que, a baixa produção de espécies nativas pela piscicultura brasileira em relação ao seu grande potencial, se deve em grande parte ao baixo conhecimento científico sobre a biologia dessas espécies, e por consequência, faltam tecnologias aprimoradas especificamente para cada uma delas.

As pesquisas que tornaram possível novas tecnologias na piscicultura de países desenvolvidos são em especial as que envolvem o controle da reprodução e dos aspectos que afetam a produção de peixes, sendo baseadas principalmente em abordagens moleculares para o estudo fisiológico de cada espécie. Além disso, essas pesquisas são fundamentais para compreender a ecologia e os possíveis efeitos e/ou alterações ambientais que podem causar mudanças nas populações naturais de uma espécie (SERVILI et al., 2020).

E apesar dos papéis importantes desempenhados pelo sistema GnRH no funcionamento da fisiologia reprodutiva, nenhum estudo até então investigou a atuação deste sistema no tambaqui, *Colossoma macropomum*. Desta forma, o presente estudo constitui-se em caracterizar e projetar primers específicos para os genes que codificam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR), presentes no genoma e transcriptomas do tambaqui, contribuindo com informações importantes para desvendar os possíveis mecanismos que controlam a reprodução nesta espécie amazônica de grande importância econômica e ecológica, possibilitando o início de melhorias na sua indução reprodutiva artificial através do desenvolvimento de protocolos espécie-específicos, e permitindo também a ampliação de investigações na endocrinologia reprodutiva de espécies filogeneticamente relacionadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Reprodução em peixes teleósteos: O eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal

A reprodução em peixes é um evento desencadeado pela integração de informações ambientais externas (temperatura, fotoperíodo, migração entre outros) e

endógenas, através de cascatas de eventos fisiológicos (HONJI; MOREIRA, 2017). Nos peixes teleósteos, bem como em todos os vertebrados, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) constitui o sistema neuroendócrino que rege o processo reprodutivo, envolvendo a síntese e secreção de gonadotrofinas, esteróides gonadais e hormônios sexuais. Nesse sistema, os neurônios de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) realizam a parte central do processo regulando a síntese e secreção das duas gonadotrofinas, o hormônio folículo estimulante (FSH / GTH - I) e o hormônio luteinizante (LH/ GTHII), esses dois hormônios são responsáveis pelo processo de gametogênese gonadal em todos os animais vertebrados e ambos são glicoproteínas heterodiméricas que compartilham uma subunidade proteica chamada de α , ou seja, tais hormônios são constituídos de outra subunidade β específica para sua função (CERDÁ-REVERTER; CANOSA, 2009).

Nos peixes teleósteos, as populações neuronais que sintetizam GnRH localizam-se na região pré-óptica do hipotálamo cerebral e prolongam suas fibras até a região da adeno-hipófise que contém as células gonadotróficas (células de LH e FSH), ou seja, permitem o contato sináptico que determina em muitas espécies de peixes o papel regulador do decapeptídeo de GnRH na síntese e secreção de gonadotrofinas. Em elasmobrânquios e peixes ósseos não teleósteos com nadadeiras raiadas esse sistema apresenta-se de forma anatomicamente diferente, onde um canal hipotalâmico-hipofisário chamado de eminência mediana forma uma grande rede capilar sanguínea que permite o transporte de neurohormônios hipotalâmicos para à adeno-hipófise de forma similar aos humanos e outros mamíferos, onde anatomia desse sistema é bem descrita (DUFOR et al., 2020).

Em geral, os eventos fisiológicos da reprodução em peixes são caracteristicamente rítmicos e iniciam a partir do momento em que a idade e peso mínimo são atingidos, sendo o ciclo reprodutivo regulado por fatores ambientais periódicos e repetitivos (anual), consistindo em sinais confiáveis e sincronizados com a fisiologia dos peixes, o que determina o sucesso reprodutivo de muitas espécies (SERVILI et al., 2020). Os fatores ambientais iniciais e determinantes desse processo são percebidos e decodificados em impulsos nervosos (neurotransmissores) ou sinais neuroendócrinos (melatonina) pela glândula pineal, atingindo direta ou indiretamente a síntese de neurohormônios hipotalâmicos como o GnRH, que ao ser secretado na região hipofisária, age estimulando a síntese e liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH), estes são secretados na corrente sanguínea

e atuam diretamente nas gônadas (órgãos responsáveis pela produção de gametas e de esteroides sexuais) controlando a atividade fisiológica do ovário e testículo.

Diferente dos mamíferos onde inicialmente ocorre estimulação pelo LH, em muitas espécies de peixes teleósteos a regulação das gônadas envolve um estímulo inicial de FSH, que nas fêmeas impulsiona a síntese de aromatase pelas células da granulosa, e essa enzima realiza a conversão da testosterona em estradiol, iniciando o processo vitelogênico (acúmulo de vitelo nos oócitos), através da síntese de vitelogenina no fígado. Posteriormente ocorre o aumento dos níveis do hormônio luteinizante, desencadeando os eventos característicos da maturação final do oócito, como a quebra da vesícula germinativa, retomada da meiose e liberação do primeiro corpúsculo polar (ALMEIDA, 2013; NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008).

Em muitas espécies de peixes e principalmente nas reofílicas, a ausência de desenvolvimento e/ou maturação final dos oócitos (determinadas pela produção correta das gonadotrofinas) é o principal motivo da baixa eficiência reprodutiva em cativeiro (SOLIS-MURGAS et al., 2011). No cativeiro, essas disfunções reprodutivas podem acontecer em diferentes graus e o não desenvolvimento representa a condição mais severa e difícil de contornar, no entanto, em algumas espécies como o tambaqui, a fase inicial de desenvolvimento dos oócitos acontece (vitelogênese completa) seguida pelo início da disfunção conhecida como “fase de dormência” em que o processo de oogênese permanece estagnando (ANDRADE; YASUI, 2003; ZOHAR; MYLONAS, 2001). Atualmente, visando sanar as disfunções em ambiente de cativeiro, diversos produtos têm explorado o uso de análogos do peptídeo de GnRH, amplamente aceito como a principal molécula que inicia a cascata reprodutiva em quase todos os vertebrados, em que poucas exceções de outras moléculas relacionadas a essa função foram relatadas nas espécies dourada, robalo, peixe-zebra, truta arco-íris, tilápia e gourami azul, atuando em vias compensatórias ou em cooperação com a molécula de GnRH, como é o caso do polipeptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário (PACAP) relatado em gourami-azul (YANG et al., 2010; FELIP et al., 2009; KITAHASHI; OGAWA; PARHAR, 2009; CERDÁ-REVERTER et al., 1999; YARON et al., 2001; LEVY; DEGANI, 2012).

O peptídeo de GnRH foi isolado pela primeira vez de tecidos cerebrais de porcinos (MATSUO et al., 1971) e de ovinos (BURGUS et al., 1972), sendo o neuropeptídeo funcional uma fração de dez aminoácidos (decapeptídeo) que deriva de uma proteína maior chamada preproGnRH, essa proteína é estruturada em uma

sequência inicial de peptídeo sinal (23-26 aa) seguido pelo decapeptídeo de GnRH ao lado de um sítio de clivagem proteolítica (3 aa) altamente conservado, e por fim um peptídeo associado ao GnRH chamado GAP (48-69 aa), em que essa estrutura preproHormonal e as posições de alguns aminoácidos no decapeptídeo de GnRH (piro-Glu¹-Ser⁴-Pro⁹-Gly¹⁰-amida) são altamente conservadas entre os diferentes tipos de vertebrados (CHEHADE et al., 2020; MILLAR, 2005).

A descoberta de múltiplos genes e diferentes formas peptídicas de GnRH (mais de uma por espécie) gerou conflitos iniciais em termos de identificação, pois cada nova forma de peptídeo foi nomeada de acordo com a primeira espécie em que havia sido encontrada, o que não fornecia informações estruturais e funcionais diante do grande número de descobertas (FERNALD; WHITE, 1999), sendo atualmente descritas 44 formas peptídicas de GnRHs em vertebrados e invertebrados, e destas apenas 8 são encontradas em peixes teleósteos (Tabela 1), em que a forma de salmão sGnRH mostra-se exclusiva em peixes (ADAMS et al., 2002; CHEHADE et al., 2020).

TABELA 1. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS 8 VARIANTES DE GNRH IDENTIFICADAS EM TELEÓSTEOS

GnRHs	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	
Mammalian (mGnRH)	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Matsuo et al. (1971)
Sea bream (sbGnRH)	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Powell et al. (1994)
Salmo (sGnRH)	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	Sherwood et al. (1983)
Whitefish	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Met	Asn	Pro	Gly	Adams et al. (2002)
Catfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly	Bogerd et al. (1992)
Herring	pGlu	His	Trp	Ser	His	Ser	His	Trp	Tyr	Gly	Carolsfeld et al. (2000)
Chicken-II (cGnRH II)	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly	Yu et al. (1988)
Pejerrey	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Montaner et al. (2001)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Os estudos filogenéticos determinaram terminologias mais adequadas para a caracterização dos peptídeos de GnRH, classificando os diferentes tipos em três linhagens de genes parálogos: *gnrh1*, *gnrh2* e *gnrh3* (GAILLARD et al., 2018a; OKUBO; NAGAHAMA, 2008; ROCH et al., 2014), em que pelo menos dois genes parálogos são encontrados em cada vertebrado, sendo possível a existência de até três genes em muitos peixes teleósteos (MORGAN; MILLAR, 2004). Nessa classificação filogenética o ramo do gene *gnrh1* agrupa diversas formas de GnRH que possuem atuação sobre a hipófise, agindo na via de reprodução de anfíbios, mamíferos e de peixes.

2.2. Evolução do sistema GnRH em vertebrados

Os genes parálogos originam-se a partir de um gene ancestral através de diversos tipos de eventos de duplicação do DNA, evoluindo de forma que o destino mais comum consiste na conservação funcional de um gene parálogo e a perda de função do outro (pseudogenização), e com menor frequência pode ocorrer a subfuncionalização, em que os genes descendentes dividem as funções do ancestral, e até mesmo a neofuncionalização, no qual adquirem novas funções (PRESTON, 2016).

A distribuição na síntese dos parálogos de GnRH em cérebros de peixes evidenciou dois principais sistemas: um na região ventral do prosencéfalo (bulbo olfatório, nervo terminal, telencéfalo ventral, área pré-óptica e hipotálamo) expressando *gnrh1* e *gnrh3* (onde um possui a ação estimulatória majoritária sobre a hipófise) e o outro sistema localizado em um núcleo no mesencéfalo, expressando *gnrh2* ou cGnRH-II, um sistema conservado entre muitas espécies de vertebrados (POWELL et al., 1994a). De modo geral, peixes teleósteos apresentam pelo menos dois tipos de GnRH em seu cérebro, e o peixe-dourado (*Carassius auratus*) é a primeira espécie onde isso foi identificado, sendo encontrados os peptídeos sGnRH (gene *gnrh3*) e cGnRH-II (gene *gnrh2*) (YU et al., 1988), a partir disso, as pesquisas buscaram esclarecer as funções desses peptídeos através de estudos na distribuição espacial de cada tipo no cérebro. A caracterização das variantes cerebrais existentes na espécie dourada (*Sparus aurata*) revelou pela primeira vez a existência de até três diferentes peptídeos por espécie, sendo os tipos sbGnRH, cGnRH-II e sGnRH (genes *gnrh1*, *gnrh2* e *gnrh3*), onde a variante sbGnRH foi detectada pela primeira vez, mostrando ser a forma predominantemente armazenada na hipófise e indicando exercer funções hipofisiotróficas (POWELL et al., 1994b).

As hipóteses evolutivas iniciais consideravam o gene *gnrh3* como exclusivo na linhagem dos teleósteos (GAILLARD et al., 2018b; KAH et al., 2007; KIM et al., 2011; OKUBO; NAGAHAMA, 2008; TOSTIVINT, 2011). Porém, após sua descoberta no genoma da lampreia (DECATUR et al., 2013) e também do celacanto (YUN et al., 2015) o cenário evolutivo mudou e atualmente é proposto que as três linhagens (*gnrh1*, *gnrh2* e *gnrh3*) foram originadas no início da evolução dos vertebrados, através de dois eventos de duplicação do genoma completo (1R e 2R), em que logo após o 2R o quarto gene de GnRH foi perdido em todas as linhagens. E, o fato de o

ramo do gene *gnrh3* conter apenas espécies de peixes indica que esse gene foi perdido totalmente nas linhagens de vertebrados terrestres (OKUBO; NAGAHAMA, 2008).

Apesar das três linhagens terem sofrido variações evolutivas de funcionalização entre os diferentes grupos de peixes existentes, a linhagem do gene *gnrh2* é uma forma altamente conservada entre todos os vertebrados, sendo, portanto, presente tanto nos sistemas de peixes que só possuem 2 genes parálogos quanto no sistema de peixes que apresentam 3 genes parálogos. De acordo com Zohar et al. (2010), os estudos conduzidos em peixes que possuem 3 genes parálogos como o peixe-branco (*Coregonus clupeaformis*), *Cichlasoma dimerus*, a corvina (*Micropogonias undulatus*) e o medaka (*Oryzias latipes*) mostram que a distribuição dos neurônios que expressam *gnrh1* e *gnrh3* apresentam sobreposições em tecidos cerebrais como bulbo olfatório, telencéfalo ventral e região pré-óptica, e essa sobreposição espacial foi investigada inicialmente no robalo-europeu (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2002; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2001), apesar desse fato, evidências em espécies perciformes com três genes parálogos sugerem que o *gnrh1* cumpre a função hipofisiotrófica, pois seus neurônios são a principal fonte de inervação da hipófise na região próxima às células gonadotróficas. Em diferentes grupos de peixes que possuem apenas dois genes parálogos de GnRH, o evento de pseudogenização ou deleção total do gene ocorreu nesse sistema onde *gnrh1* e *gnrh3* possuem distribuição sobreposta, e resultou na fixação de algum dos dois genes, garantindo a função reprodutiva, como em zebrafish (*Danio rerio*), que possui deleção total do gene *gnrh1* do seu genoma e apresenta inervação abundante na hipófise de neurônios que expressam *gnrh3* (CHEHADE et al., 2020).

A atuação dos peptídeos ocorre através da ativação dos seus receptores (GnRHR) pertencentes à superfamília do receptor acoplado à proteína G 7-transmembrana (GPCR), e ao contrário dos mamíferos em que essa ação é mediada apenas por dois subtipos de receptores, os peixes teleósteos podem apresentar muitos parálogos resultantes dos diferentes rounds de duplicação do genoma completo, onde através de um 4R específico dos salmonídeos originou no Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) 6 genes para receptores de GnRH (CIANI et al., 2020). Mas, independentemente do cenário que originou essa diversidade de genes, os receptores em peixes teleósteos são classificados em dois subtipos de receptores (1 e 2), com pelo menos dois parálogos em cada (SEFIDEH et al., 2014).

2.3. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um peixe neotropical da classe Actinopterygii, ordem Characiformes e subfamília Serrasalminae (ARAUJO LIMA; GOULDING, 1998), atualmente é descrita no gênero *Colossoma*, que anteriormente agrupava a pirapitinga e o pacu, espécies estritamente relacionadas com o tambaqui e alvos do mercado na produção de híbridos entre estas espécies (WOYNÁROVICH; VAN ANROOY, 2019), estes três peixes destacam-se como as maiores espécies da subfamília Serrasalminae, sendo o tambaqui a principal espécie de importância econômica nas Américas (FishStat, 2018), com distribuição geográfica natural restrita às Bacias do Amazonas e Orinoco em Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. (ARAUJO LIMA; GOULDING, 1998). A espécie possui potencial para alcançar até 90 cm de comprimento total e 30 kg de peso, sendo considerada uma espécie de grande porte, e possui ontogenia marcada por grandes mudanças que ocorrem principalmente em sua forma e coloração, sendo isso o principal motivo de 12 nomes científicos e seis diferentes gêneros já terem sido atribuídos à espécie. Características como a ausência de um espinho pré-dorsal e a presença de um grande opérculo determinam a origem do nome em Latim, onde “*Colossoma*” significa corpo sem chifres e “*macropomum*” grande opérculo (ARAUJO LIMA; GOULDING, 1998).

A alimentação em seu habitat natural varia de acordo com o tamanho do indivíduo, no qual os jovens possuem uma dieta baseada em algas, arroz silvestre, insetos e larvas de quironomídeos e os adultos principalmente em frutos, sementes e zooplâncton (ARAUJO LIMA; GOULDING, 1998) e varia também de acordo com os períodos de cheia e vazante, onde pelo menos 133 espécies de árvores e frutos foram descritas fazendo parte da sua dieta (SILVA et al, 2003). Possui hábito diurno e fecundação externa, sendo uma espécie de desova total, que necessita realizar a “piracema”, evento de migração que culmina na desova em águas com temperatura em torno de 27°C, característico das regiões litorânea dos rios (ARAUJO LIMA; GOULDING, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Analisar os genes parálogos e peptídeos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR) em tabaqui, visando o desenvolvimento de tecnologia para obtenção de gonadotrofinas endógenas.

3.2. Específicos:

a) Caracterizar estruturalmente os genes parálogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seu receptor (GnRHR).

b) Identificar os peptídeos codificados por cada gene.

c) Desenhar primers específicos em análises quantitativas de expressão para os parálogos do gene *gnrh* do tabaqui.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Identificação de sequências de genes do receptor *gnrh* e *gnrh* de tabaqui

A identificação e anotação dos genes foi realizada a partir de sequências obtidas no genoma de referência da espécie, disponível no GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sob o acesso: CAJGBK01, e no transcriptoma de gônadas de tabaquis adultos (ovário e testículo) e do tronco de juvenis indiferenciados, sob acesso: GSE130895.

A busca inicial das sequências foi realizada através da ferramenta *BLAST*, utilizando as sequências de aminoácidos da espécie *Pygocentrus nattereri*, depositadas no GenBank, sob acesso: (XM_017696271.1, XM_017725234.1 e XM_017708781.1). E as sequências resultantes com alta similaridade foram examinadas manualmente e anotadas (identificação de éxons, íntrons, *ORF*, *CDS* e sequência de proteínas) no software *Ugene v. 35.1*, e para a predição de éxons e junções de splicing foi considerado apenas os sítios consenso em bancos de dados genômicos, ou seja, íntrons começando com “GT” e terminando com “AG”. E, por fim, as sequências de genes foram ilustradas graficamente através da ferramenta online *Exon-Intron Graphic Maker v.4* (acesso: <http://wormweb.org/exonintron>).

4.2. Caracterização estrutural e filogenética das proteínas de GnRH do tabaqui

A obtenção da sequência *CDS* foi usada para deduzir a sequência de aminoácidos das proteínas e para a posterior identificação dos motivos e domínios conservados usando a ferramenta *SMART* (disponível em: <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Para cada gene foi construído um *dataset* com proteínas de espécies de referência no banco do Uniprot, sendo determinada a relação filogenética entre as sequências homólogas pelo método *Neighbor-joining*, com distância de máxima verossimilhança, e scores de conservação calculados com base no método *Bayesiano*.

4.3. Construção de iniciadores (“primers”) específicos e RT-qPCR

Para garantir a especificidade de cada primer foi gerado um alinhamento das sequências de mRNA dos genes parálogos (obtidas nos transcriptomas de tabaqui) no *software MEGAX*, sendo selecionadas regiões de nucleotídeos específicas para cada gene para projetar primers específicos em *RT-qPCR* usando as ferramentas de análise de sequências e desenho de primers da IDT (Integrated DNA Technologies: <https://www.idtdna.com>).

As reações de *PCR* foram realizadas com 70 ng de cDNA; 0,5 pmol de cada primer (*forward* e *reverse*); 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 2 mM de MgCl₂; 1 mM de dNTPs e uma unidade de *Taq DNA Polimerase* (DNA Express) para um volume final de 20 µL. A especificidade dos primers foi confirmada pela obtenção de um único produto de amplificação de *PCR* convencional (com o tamanho de amplicon esperado para cada primer) observados em gel de eletroforese, e principalmente através do sequenciamento de cada amplicon. Para isso, os produtos de *PCR* foram tratados com *ExoSAP-IT* e sequenciadas usando o *kit BigDye™ Terminator v3.1*, no *3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)* seguindo as recomendações do fabricante. Ao final, foi gerado uma sequência consenso para cada gene, obtida com base nas regiões de qualidade do sequenciamento das fitas *forward* e *reverse* analisadas manualmente pelos dados de eletroferograma.

Para a validação da eficiência dos primers em reações de RT-qPCR, foi realizado o teste de eficiência de amplificação usando o *kit Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems)*, sendo a eficiência de amplificação a taxa em que um amplicon de *PCR* é gerado, onde as reações com 100% de eficiência são as que

ocorrem a duplicação da quantidade de amplicon a cada ciclo da PCR. Para isso, foram utilizados os valores do *Cycle Threshold* (Ct) de cinco pontos de diluição (Puro, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256) de um “pool de cDNA cerebral” para a definição da curva padrão, onde as amostras puras continham 70ng de cDNA. Os valores do *Cycle Threshold* em cada ponto de diluição foram utilizados para análise do slope e da eficiência de amplificação. A *RT-qPCR* dos genes alvos foi realizada em software *7.500 Fast Real-Time PCR System v2.3 (Applied Biosystems)*, em duplicatas para cada ponto de diluição. A curva de melting foi analisada no final de cada PCR para confirmação de apenas um produto amplificado e detectado. Diante disso, a validação dos resultados utilizou o método $\Delta\Delta C_t$, usando o gene β -actin como normalizador (Nascimento et al., 2016).

4.4. Coleta e amostragem

Para as amostragens, foram coletados 20 peixes em diferentes estágios de maturação do viveiro da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Em seguida, os peixes foram anestesiados com benzocaína na concentração de 150 mg/L e abatidos com secção da medula espinhal, dessa forma foram coletadas amostras de gônadas e as 4 regiões cerebrais alvo (hipotálamo, hipófise, bulbo olfatório e cérebro), as amostras foram imediatamente imersas na solução estabilizante *RNAlater™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)* por 24h e em seguida armazenadas à -80°C para posterior extração total dos ácidos ribonucleicos. Para a determinação do estágio de maturação por histologia, foi realizada a fixação da gônada contralateral em glutaraldeído 5% para cada peixe coletado.

4.5. Análise histológica das gônadas

As gônadas fixadas em glutaraldeído 5% durante um período de 24 horas, foram transferidas e mantidas por mais 24 horas em solução de Tampão Fosfato, sendo em seguida desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 96%, 100% 2x) e incluídas em historesina para a microtomia a 5 μ m, possibilitando definir os estágios de maturação de cada indivíduo.

4.6. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras de gônadas e regiões cerebrais foi obtido pelo método *guanidinium-acid-phenol*, utilizando o reagente Trizol (Life Technologies;

Carsbald, USA) na proporção de 1 mL para cada 100mg de tecido, sendo lisados em *Tissue Lyser*, possibilitando a separação e isolamento de RNA total.

As amostras foram então submetidas à digestão de DNA pela RQ1 (RNA Qualified) *RNase-Free DNase* da Promega, seguindo as recomendações do fabricante, para eliminação de qualquer possível contaminação com DNA. A pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria (*Nanodrop 1000; Thermo Scientific*) e apenas as amostras com a razão 260/280 entre 1,8 e 2,1 foram convertidas em cDNA, e em adição a integridade das amostras de RNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. Apenas as amostras com RNA de alta qualidade foram transcritas reversamente em cDNA utilizando o kit *GoScript® Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WIS, USA), amostras usadas no “pool cerebral” (amostra combinada de cDNA cerebral de todos os indivíduos) posteriormente utilizado para o ensaio de eficiência de amplificação dos primers alvos em *PCR* quantitativa em tempo real (*RT-qPCR*).

5. RESULTADOS

5.1. Estrutura dos genes parálogos de *gnrh* do tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O sistema GnRH em tambaqui é composto por 3 genes parálogos ligantes (*cmgnrh1*, *cmgnrh2* e *cmgnrh3*) e 3 parálogos de receptores (*cmgnrhr1ca*, *cmgnrhr1c* e *cmgnrhr2b*), nomeados de acordo com as suas relações filogenéticas e análises de sintonia, sendo o gene *cmgnrh3* (sGnRH) um pseudogene ainda transcricionalmente ativo. As sequências foram analisadas após o sítio em que inicia a transcrição, sendo o tamanho total de cada gene 619pb, 1894pb e 8395pb, para *cmgnrh1*, *cmgnrh2* e *cmgnrh3* respectivamente, e em todos os íntrons foram identificados sítios de splicing consenso, caracterizados como GT e AG. As sequências estão disponíveis no GenBank (sob acesso: *cmgnrh1*, LOC118812890; *cmgnrh2*, LOC118820047; *cmgnrh3*, LOC118823732). Os genes *cmgnrh1* e *cmgnrh2* possuem uma estrutura semelhante, contendo 3 éxons e dois íntrons, em que o éxon 1 contém a informação que codifica a região não traduzida 5' (UTR), o peptídeo sinal, o decapeptídeo de GnRH, um sítio de clivagem Gly-Lys-Arg e a região N-terminal do peptídeo associado ao GnRH (GAP). O éxon 2 codifica a porção intermediária do GAP, e o éxon 3 contém a região C-terminal do GAP e a região não traduzida 3' (UTR) (Figura 1).

O transcrito completo do gene *cmgnrh1* foi localizado no contig DN52353_c0_g1_i1 do transcriptoma de testículo e juvenis durante a diferenciação (2-4cm), o gene codifica uma proteína preproGnRH de 85 aa. Não foi possível localizar transcritos do gene *cmgnrh2*, dessa forma o desenho de iniciadores “primers” foi realizado com base apenas na sequência genômica (LOC118820047) que contém uma ORF para proteína funcional de 90 aa.

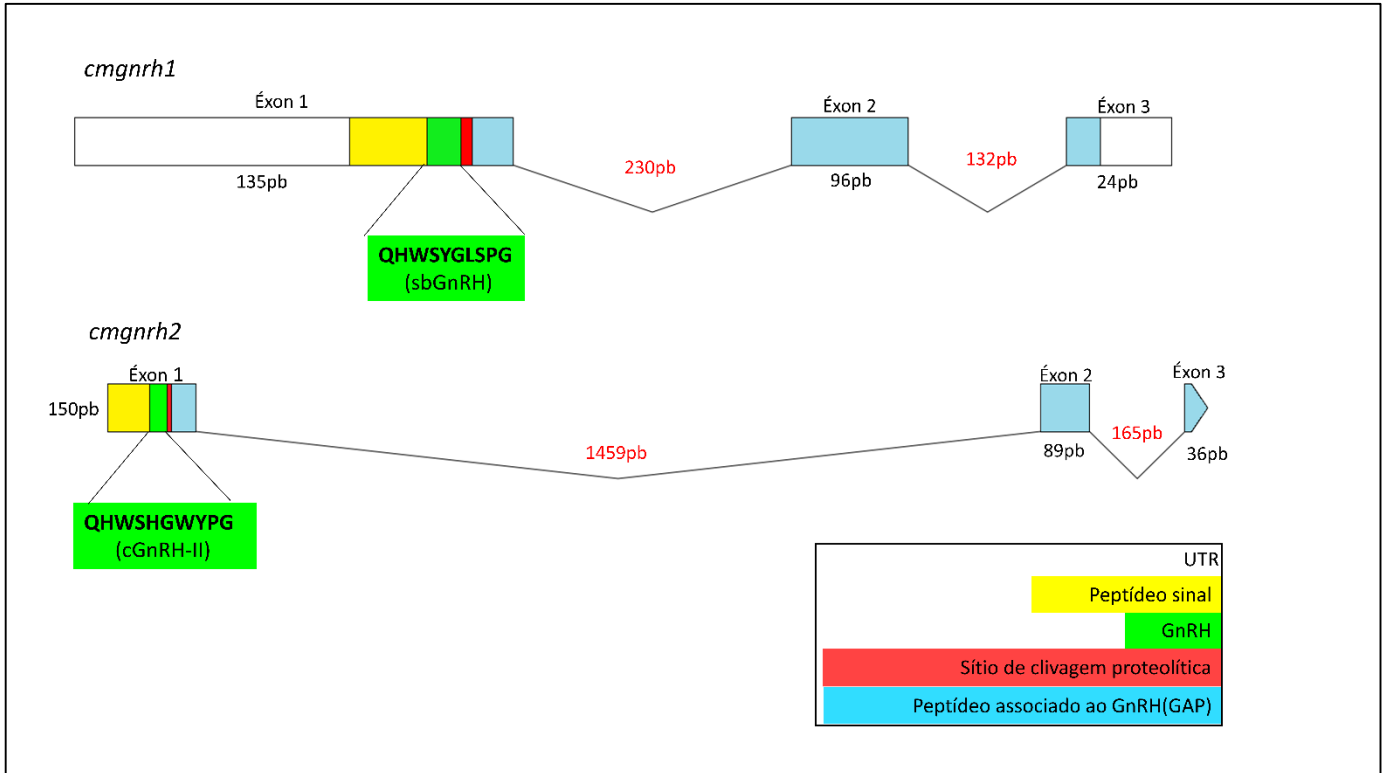


Figura 1. Esquema estrutural dos genes *gnrh1* e *gnrh2* do tambaqui, *Colossoma macropomum*.

O gene *cmgnrh3* apresenta uma estrutura com 4 éxons e 3 íntrons, e neste gene o éxon 1 apresenta uma grande região não traduzida 5' (UTR) e o início do peptídeo sinal. O éxon 2 contém o resto do peptídeo sinal, o decapeptídeo de sGnRH (salmão), o sítio de clivagem Gly-Lys-Arg e a região N-terminal do peptídeo associado ao GnRH (GAP). O éxon 3 codifica a porção intermediária do GAP e o éxon 4 contém a região C-terminal do GAP e a região não traduzida 3' (UTR) (Figura 2).

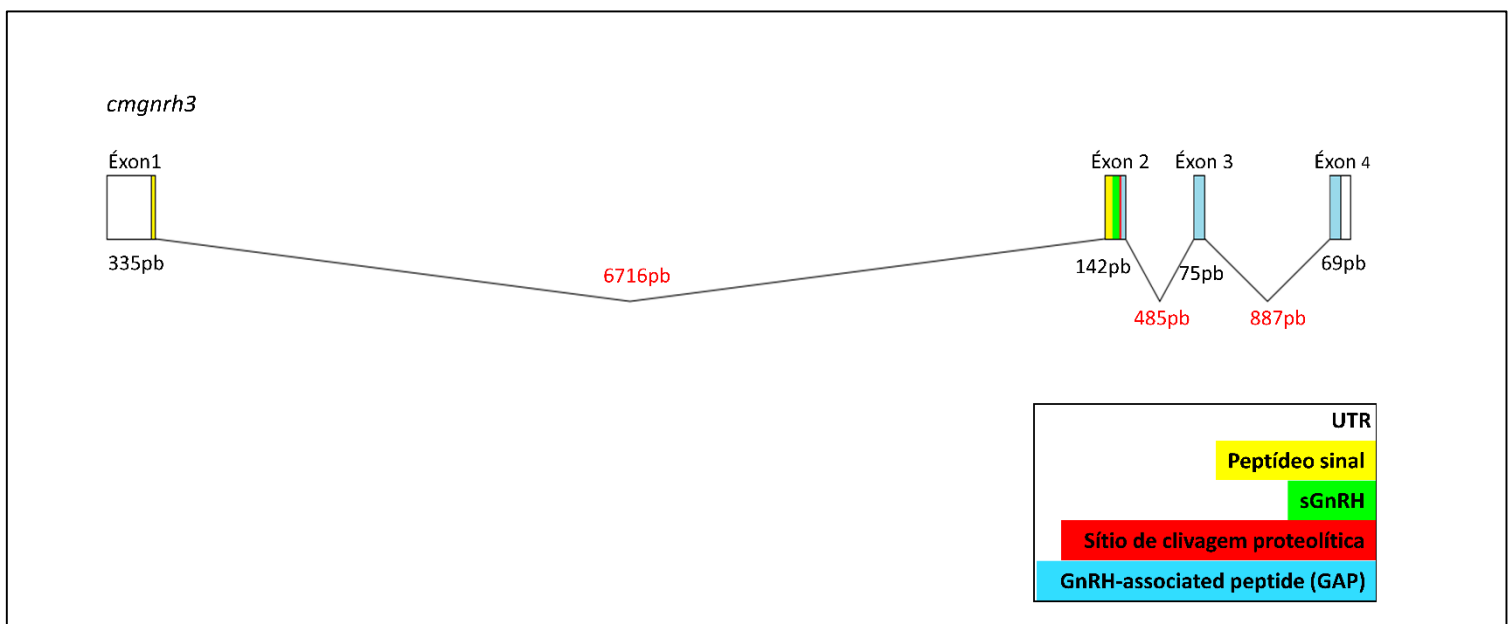


Figura 2. Esquema estrutural do gene *gnrh3* do tambaqui, *Colossoma macropomum*.

A sequência genômica (LOC118823732) prediz duas prováveis proteínas, a variante X1 com 117 aa e a variante X2 com 104 aa, no entanto, a comparação da sequência genômica com transcritos completos de ovário, testículo e juvenis indiferenciados (contig: DN270770_c0_g1_i1) mostra que os transcritos apresentam outra sequência de éxon 1 e as preditas no GenBank estão dentro de uma grande sequência de íntron 1 (6716pb). O transcrito não possui um início possível (ATG) antes do éxon 2 que contém a informação para o decapeptídeo de sGnRH, apresentando apenas sítios de start no início dos éxons 3 e 4, que codificam grande parte do peptídeo associado ao GnRH (Figura 3). Um transcrito alternativo com retenção parcial do íntron 1 (479pb) e início do éxon 2 (64pb) foi encontrado no contig DN37474_c0_g1_i1 dos transcriptomas de testículo e juvenis indiferenciados (um indivíduo do grupo de putativos machos).

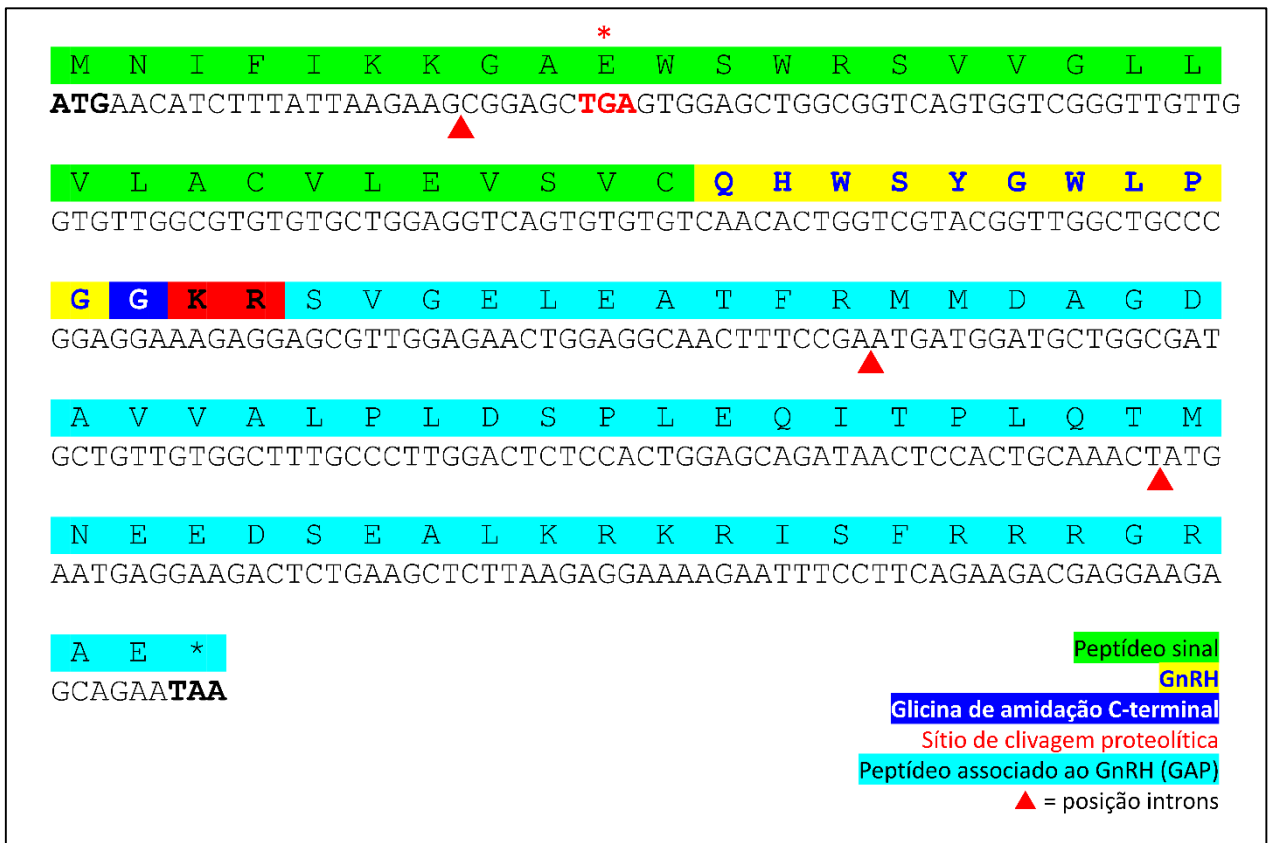


Figura 1. mRNA do gene *cmgnrh3* evidenciando o códon de parada prematuro no éxon 2.

Os peptídeos preditos para os genes ligantes do tambaqui *cmgnrh1*, *cmgnrh2* e *cmgnrh3* produzem as variantes sbGnRH (*seabream*), cGnRH-II (*chicken-II*) e sGnRH (*salmo*), não sendo possível a produção do decapeptídeo de salmão a partir dos transcritos gonadais analisados neste estudo para esse gene.

5.2. Estrutura dos genes *gnrhr* de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Os genes receptores *cmgnrhr1ca*, *cmgnrhr1c* e *cmgnrhr2b*, possuem tamanho total de 7.704bp, 8.680bp e 3.748bp respectivamente, e apresentam uma estrutura de 3 éxons e 2 íntrons, todos com ORF's para a produção das proteínas receptoras (Figura 4). A caracterização manual das sequências de receptores teve os mesmos critérios usados para as sequências de ligantes, com a sobreposição de dados transcriptômicos do tambaqui com as sequências do genoma de referência. Onde não foi possível identificar transcritos do gene *cmgnrhr1ca*, porém sua estrutura predita contém uma ORF possível para a produção correta da proteína.

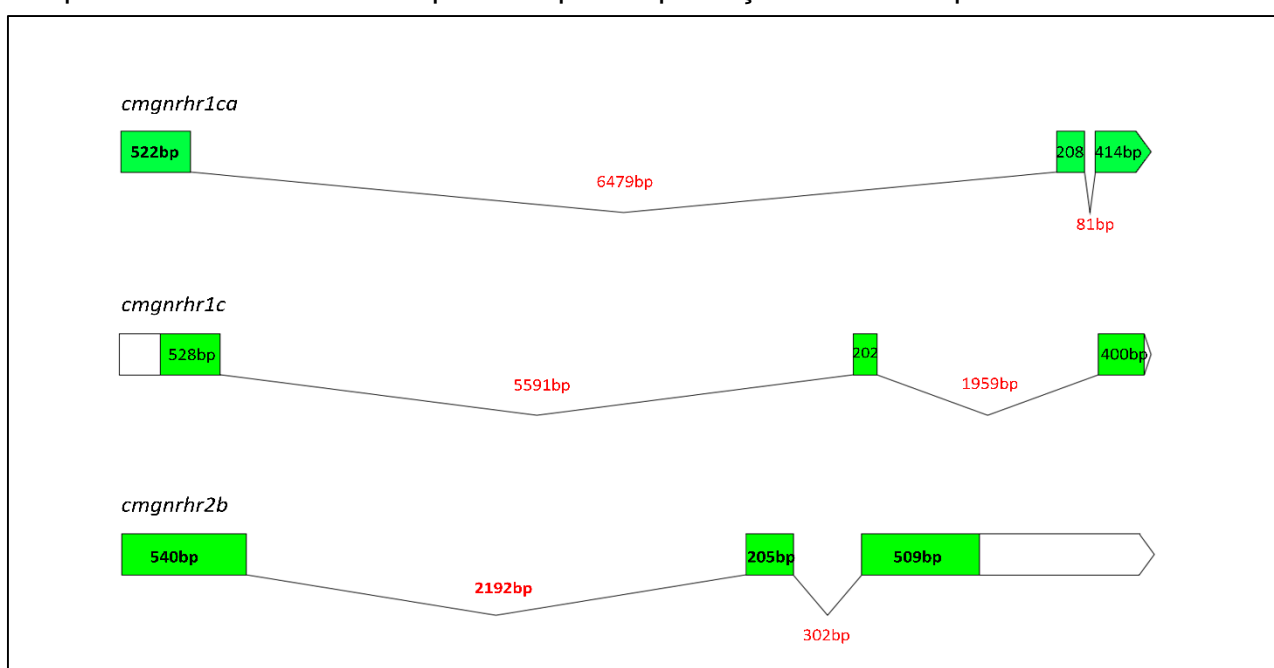


Figura 2. Caracterização estrutural de genes receptores de GnRH do tambaqui, *Colossoma macropomum*.

O gene *cmgnrhr1c* está predito como um pseudogene no genoma de referência da espécie, em que a sequência genômica (LOC118813435) comparada com o transcrito parcial (DN53138_c0_g1_i1) apresenta a inserção de 1 nucleotídeo de adenina na posição 209 do éxon 1 gerando diversos pontos de parada, consequentemente essa sequência está predita como um pseudogene no NCBI. Contudo, nossas análises sugerem fortemente a possibilidade de um erro de sequenciamento ou presença de polimorfismo SNP, pois no transcriptoma de cérebro e de juvenis indiferenciados não há inserção, revelando a transcrição de uma ORF capaz de codificar a proteína funcional, e que um possível mecanismo de splicing alternativo ocorre reduzindo “in frame” (213pb) do éxon 1.

O terceiro parálogo (*cmgnrhr2b*) foi analisado a partir de um transcrito parcial (DN90827_c0_g1_i1) contendo uma parte final do éxon 1, e os éxons 2 e 3 completos nos transcriptomas de gônadas e corpo de juvenis, o início do éxon 1 foi analisado a partir da sequência genômica e contém o código para o início da proteína de forma funcional. As sequências de receptores estão disponíveis no GenBank (acesso: *cmgnrhr1ca*, LOC118805059; *cmgnrhr1c*, LOC118813435; *cmgnrhr2b*, LOC118801378).

5.3. Construção de iniciadores específicos (“primers”)

Inicialmente foi realizado um alinhamento das sequências transcritas dos genes parálogos de *gnrh* (Figuras 5, 6 e 7) e *gnrhr*, possibilitando projetar iniciadores de cadeia em regiões específicas de cada gene, usando os transcritos completos (*cmgnrhr1*: DN52353_c0_g1_i1; *cmgnrhr3*: DN270770_c0_g1_i1) juntamente com a sequência de mRNA predita para *cmgnrhr2* a partir da sequência genômica (Figuras 5, 6 e 7).

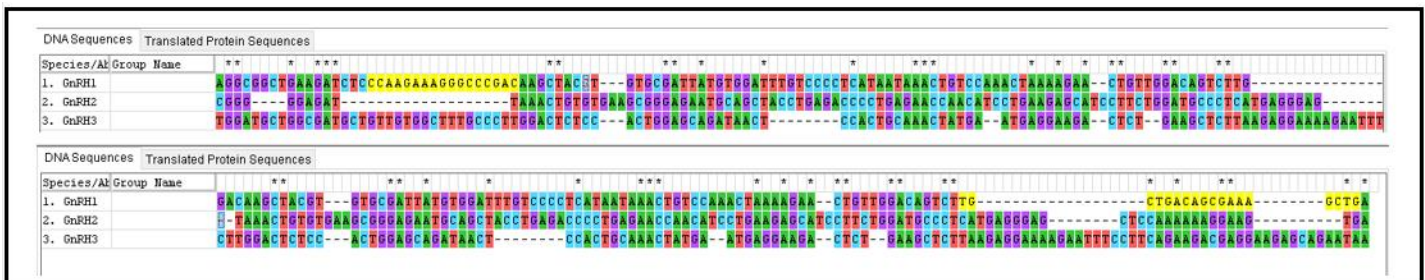


Figura 5. Alinhamento dos transcritos de *gnrh*, destacado em amarelo os primers Foward e Reverse de *cmgnrhr1*.

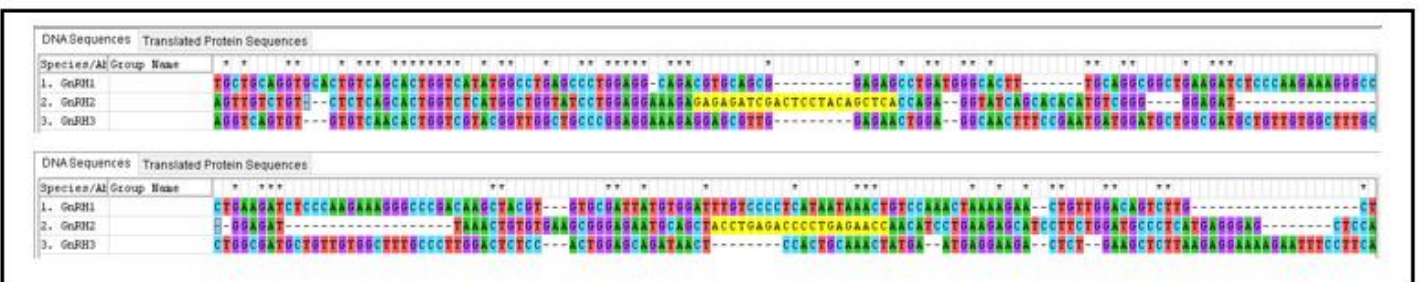


Figura 6. Alinhamento dos transcritos de *gnrh*, destacado em amarelo os primers Foward e Reverse de *cmgnrhr2*.

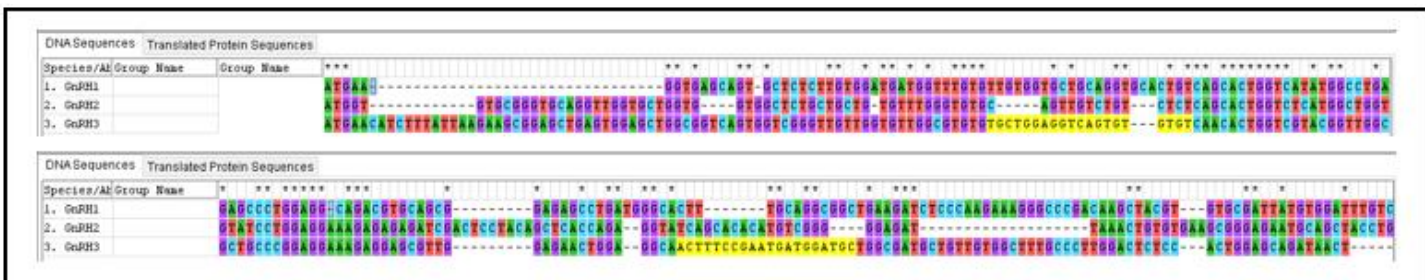


Figura 7. Alinhamento dos transcritos de *gnrh*, destacado em amarelo os primers Foward e Reverse de *cmgnrhr3*.

TABELA 2. PRIMERS FOWARD E REVERSE DE LIGANTES E RECEPTORES DE GnRH PARA TAMBAQUI.

Gene	Amplicon (pb)	Sequence (5'-3')	Orientação
RT-qPCR	<i>cmgnrh1</i>	CCAAGAAAGGGCCCGAC	Forward
		CAGCTTTCGCTGTCAGCA	Reverse
	<i>cmgnrh2</i>	GAGAGATCGACTCCTACAGCTCA	Forward
		GGTTCTCAGGGGTCTCAGGT	Reverse
	<i>cmgnrh3</i>	TGCTGGAGGTCAGTGTGTGT	Forward
		GCATCCATCATTCCGAAAGT	Reverse
	<i>cmgnrhr1c</i>	TTCCTCTTTGCGGCAGTCAGT	Forward
		CCATGTCCAGTGGCATCACGAT	Reverse
	<i>cmgnrhr1ca</i>	GAAGCAAGGACAAGGCAGGAGAG	Forward
		TCAGGGATCACCTGCAGCA	Reverse
	<i>cmgnrhr2b</i>	CTAAGCGCGTCTCTTGAAA	Forward
		ATCCTCTGTGCTACCTGAA	Reverse

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A especificidade dos primers *cmgnrh1*, *cmgnrh2* e *cmgnrh3* foi comprovada pela análise do tamanho dos amplicons em gel de eletroforese e sequenciamento de Sanger para os genes *cmgnrh1* e *cmgnrh3*, confirmando serem específicos também através do BLAST da sequência consenso no NCBI.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Colossoma macropomum pragonadoliberin-1-like (LOC118812890), m...	<i>Colossoma macropomum</i>	158	158	100%	6e-35	100.00%	446	XM_036578001.1

Figura 8. Resultado do BLAST no NCBI da sequência consenso para *cmgnrh1*.

Query Length
98

Other reports
[Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?

select all 3 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) New [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Colossoma macropomum</i> gonadotropin-releasing hormone 3 (gnrh3), transcript var...	<i>Colossoma m...</i>	182	182	100%	5e-42	100.00%	556	XM_036593510.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Colossoma macropomum</i> gonadotropin-releasing hormone 3 (gnrh3), transcript var...	<i>Colossoma m...</i>	182	182	100%	5e-42	100.00%	640	XM_036593509.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Pygocentrus nattereri</i> gonadotropin-releasing hormone 3 (gnrh3), mRNA	<i>Pygocentrus n...</i>	150	150	97%	1e-32	94.79%	401	XM_017708781.2

Figura 9. Resultados do BLAST no NCBI da sequência consenso para *cmgnrh3*.

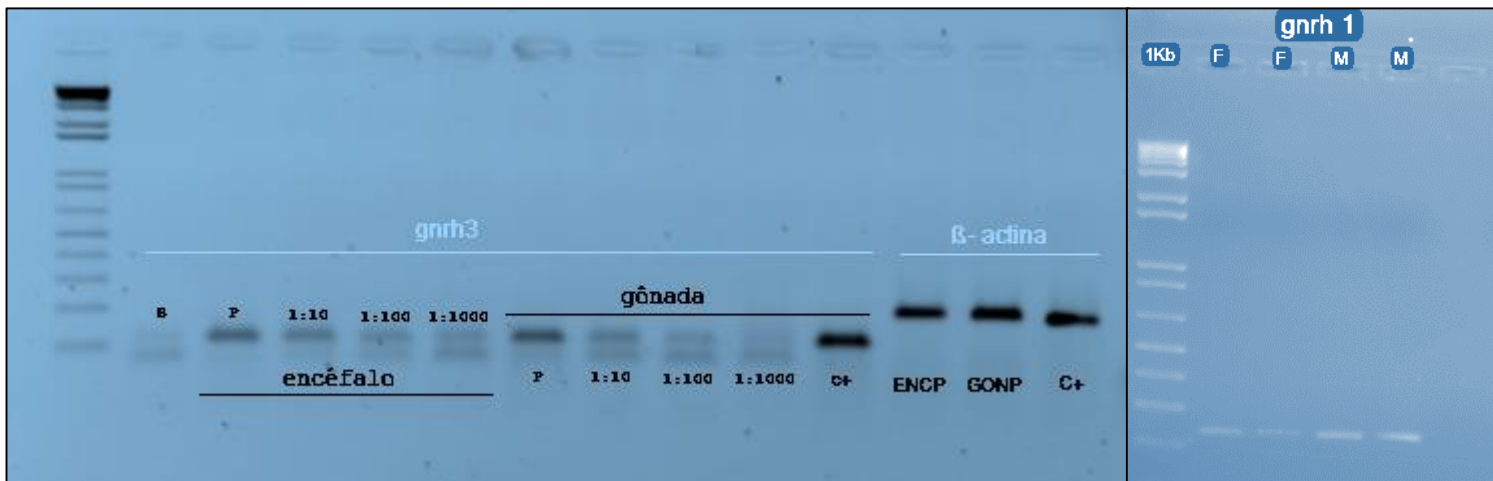


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com amplicons dos genes *cmgnrh1*, *cmgnrh3* e β -actina

5.4. Ensaio de validação da eficiência dos primers em reações de RT-qPCR

O ensaio de eficiência da amplificação de cada primer foi testado com o sistema de detecção *SYBR Green* e normalizado com os valores de Ct do gene endógeno β -actina, o que assegura a qualidade desta análise, evitando resultados falsos negativos. O ponto 1 refere-se a amostra pura enquanto os 2, 3, 4 e 5 são das diluições 1:4, 1:16, 1:64 e 1:256 respectivamente, no ensaio de RTqPCR a diferença no sinal de Ct de um ponto de diluição para o próximo apresentou uma média de 2 ciclos mais tardios. A curva padrão e os resultados de r^2 mostram eficiências baixas a partir do 2 ponto de diluição para os primers *cmgnrhr1* e *cmgnrh2* e uma alta eficiência de amplificação para o primer *cmgnrh3*, com valor semelhante ao do controle endógeno β -actina em eficiência da amplificação (Figura 11).

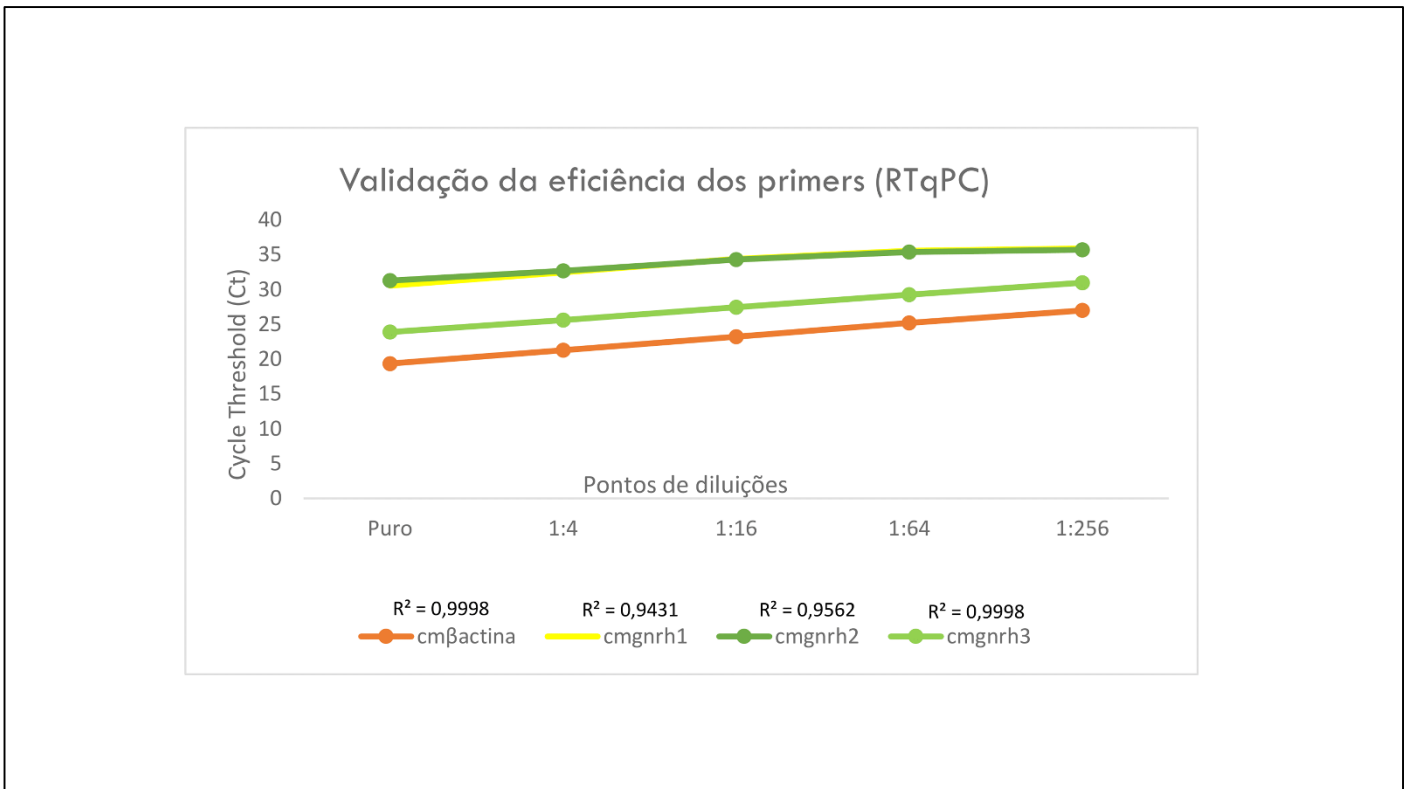


Figura 11. Curva padrão da eficiência de amplificação dos primers para GnRH em tambaqui.

6. DISCUSSÃO

As três variantes de GnRH (sbGnRH, cGnRH-II e sGnRH) encontradas no genoma e nos transcriptomas do tambaqui (cérebro e gônadas) representam um padrão evolutivo encontrado em algumas espécies das ordens Characiformes e Perciformes, sendo relatado em espécies perciformes correlação entre os níveis de transcrição da forma sbGnRH no cérebro com o desenvolvimento ovariano, como em *Pagrus major* (SENTHILKUMARAN et al., 1999), *Verasper moseri* (AMANO et al., 2008), *Scophthalmus maximus* (ANDERSSON et al., 2001), *Morone saxatilis* (HOLLAND et al., 2001) *Paralichthys olivaceus* (PHAM et al., 2006a, 2006b), *Scomber japonicus* (SELVARAJ et al., 2012) e *Lates calcarifer* (PHAM et al., 2020).

A ordem Characiformes abrange uma diversidade de espécies representativas na América do Sul, onde os estudos sobre a atuação do sistema GnRH no processo de reprodução são escassos, em que já foi investigado através de abordagens químicas (HPLC e RIA) a presença de sbGnRH, cGnRH e sGnRH no Pacu *Piaractus mesopotamicus* (POWELL et al., 1997), Curimatá *Prochilodus lineatus* (SOMOZA et al., 1994), e através de ensaios de imuno-histoquímica foi

identificado as formas sGnRH e cGnRH-II nos Characiformes ornamentais *Paracheirodon axelrodi* e *Aphyocharax anisitsi* o tetra-cardinal e a enfermeirinha (CAMACHO, 2019), similar ao encontrado em *Astyanax altiparanae*, sendo a única espécie até então em que foi realizado estudos de caracterização à nível molecular, evidenciando a presença apenas dos genes *gnrh2* e *gnrh3* (cGnRH-II e sGnRH) e estudos da avaliação in vivo do papel desses genes através da aplicação de injeções com esses peptídeos. Curiosamente apenas o *gnrh2* foi capaz de iniciar a cascata reprodutiva e induzir a desova nesta espécie (CHEHADE et al., 2020). No tambaqui as análises in silico sobrepondo dados transcriptômicos dos genes *cmgnrh1*, *cmgnrh2* e *cmgnrh3*, revela não ser possível a formação do decapeptídeo sGnRH pela presença de um ponto de parada prematuro, portanto, o gene *cmgnrh1* (sbGnRH) pode ser o regulador primário da atividade das gonadotrofinas e, conseqüentemente, do desenvolvimento gonadal no tambaqui.

O teste de eficiência de amplificação mostrou que o conjunto de primers para *cmgnrh3* e o gene normalizador β -actina possuem eficiências semelhantes, sendo um requisito básico para a aplicação da técnica de RTqPCR, e apesar de os valores de eficiência para *cmgnrh1* e *cmgnrh2* estarem na faixa aceitável é necessário a otimização da amostra para uma concentração não tão diluída, visto que, a partir do terceiro ponto de diluição (1:16) esses primers perdem eficiência.

Esses poucos estudos já evidenciam nos Characiformes possíveis diversificação de funções que ocorrem no sistema GnRH, sendo necessárias a partir deste estudo maiores investigações sobre o perfil de transcrição desses genes no período reprodutivo do tambaqui.

7. CONCLUSÃO

O genoma do tambaqui, *Colossoma macropomum*, apresenta os genes *gnrh1*, *gnrh2* e *gnrh3* codificando as formas sbGnRH, sGnRH e cGnRH-II, sendo o gene *gnrh3* um putativo pseudogene transcricionalmente ativo e localizado em um *scaffold* que contém muitos pseudogenes anotados na região *upstream* do gene, sendo necessário um estudo mais aprofundado sobre como esse rearranjo pode ter afetado a expressão desse gene.

Atualmente diversas pesquisas buscam entender o papel dos diferentes peptídeos do sistema GnRH no ciclo reprodutivo de muitas espécies, visando o

desenvolvimento de tecnologias (análogos) para a realização de programas de reprodução para espécies em cativeiro e espécies reofílicas ameaçadas pelo desenvolvimento de hidrelétricas e/ou empreendimento que impossibilite a reprodução no ambiente natural.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, B. et al. Three Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone, Including a Novel Form, in a Basal Salmonid, *Coregonus clupeaformis*. **academic.oup.com**, v. 67, n. 1, p. 232–239, 2002.

ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 37, n. 2, p. 174–180, 2013.

AMANO, M. et al. Changes in brain seabream GnRH mRNA and pituitary seabream GnRH peptide levels during ovarian maturation in female barfin flounder. **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, n. 2, p. 168–172, 2008.

ANDERSSON, E. et al. Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: immunological characterization and seasonal variation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 2–3, p. 551–558, 2001.

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166–172, 2003.

ANDRADE, E. D. S. **Protocolos de indução hormonal em lambari (*Astyanax fasciatus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2012.

ARAÚJO LIMA, C.; GOULDING, M. Os frutos do tabaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. **Tefé: Sociedade Civil Mamirauá, 1998**.

BURGUS, R. et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 1, p. 278–282, 1972.

CAMACHO, R. **Biología reproductiva de dos especies de peces ornamentales: el neón cardinal *Paracheirodon axelrodi* y el tetra cola roja *Aphyocharax anisitsi* (Characiformes, Characidae)**. 2019. Tese de Doutorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

CERDÁ-REVERTER, J. M. et al. Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 6, 1999.

CERDÁ-REVERTER, J. M.; CANOSA, L. F. Neuroendocrine Systems of the Fish Brain. In: FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Fish Physiology**, v. 28, p. 3-74, 2009.

CHEHADE, C. et al. Molecular characterization of different preproGnRHs in *Astyanax altiparanae* (Characiformes): Effects of GnRH on female reproduction. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 6, p. 720–734, 1 jun. 2020a.

CHEHADE, C. et al. Molecular characterization of different preproGnRHs in *Astyanax altiparanae* (Characiformes): Effects of GnRH on female reproduction. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 6, p. 720–734, 1 jun. 2020b.

CIANI, E. et al. GnRH receptor *gnrhr2bb α* is expressed exclusively in *lhb*-expressing cells in Atlantic salmon male parr. **General and Comparative Endocrinology**, v. 285, p. 113293, 1 jan. 2020.

DECATUR, W. A. et al. Insight from the lamprey genome: glimpsing early vertebrate development via neuroendocrine-associated genes and shared synteny of gonadotropin. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, p. 237–245, 2013.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. 7 Induced Final Maturation, Ovulation, and Spermiation in Cultured Fish. **Fish physiology**, v. 9, p. 351–403, 1983.

DUFOUR, S. et al. Origin and evolution of the neuroendocrine control of reproduction in vertebrates, with special focus on genome and gene duplications. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 2, p. 869–943. 2020.

FELIP, A. et al. Evidence for two distinct *KiSS* genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 312, n. 1–2, p. 61–71. 2009.

FERNALD, R. D.; WHITE, R. B. Gonadotropin-releasing hormone genes: Phylogeny, structure, and functions. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, n. 3, p. 224–240, 1999.

GAILLARD, A. L. et al. Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) genes from cartilaginous fish: Evolutionary perspectives. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. SEP, p. 607, 6 set. 2018a.

GAILLARD, A. L. et al. Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) genes from cartilaginous fish: Evolutionary perspectives. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. SEP, p. 607, 6 set. 2018b.

GONZALEZ-MARTINEZ, D. et al. Immunohistochemical Localization of Three Different prepro-GnRHs in the Brain and Pituitary of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Using Antibodies to the Corresponding GnRH-Associated Peptides. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 446, n. 2, p. 95–113, 29 abr. 2002.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D. et al. Differential Expression of Three Different Prepro-GnRH (Gonadotrophin-Releasing Hormone) Messengers in the Brain of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 429, n. 1, p. 144-155, 2001.

HOLLAND, M.; HASSIN, S.; ZOHAR, Y. Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development. **Journal of endocrinology**, v. 169, n. 3, p. 527-538, 2001.

HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleosteos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 41, n. 1, p. 86–93, 2017.

HUNTER, George A.; DONALDSON, Edward M. 5 Hormonal sex control and its application to fish culture. **Fish physiology**, v. 9, p. 223-303, 1983.

KAH, O. et al. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. **General and comparative endocrinology**, v. 153, n. 1–3, p. 346–364, 2007.

KIM, D. et al. Revisiting the evolution of gonadotropin-releasing hormones and their receptors in vertebrates: secrets hidden in genomes. **General and comparative endocrinology**, v. 170, n. 1, p. 68–78, 2011.

KITAHASHI, T.; OGAWA, S.; PARHAR, I. S. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 821–831, fev. 2009.

LEVY, G.; DEGANI, G. Involvement of GnRH, PACAP and PRP in the reproduction of blue gourami females (*trichogaster trichopterus*). **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 48, n. 3, p. 603–616, 8 nov. 2012.

MATSUO, H. et al. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, n. 6, p. 1334–1339, 1971.

MILLAR, R. P. GnRHs and GnRH receptors. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 1–2, p. 5–28, 2005.

MORGAN, K.; MILLAR, R. P. Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species. **General and comparative endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 191-197, 2004.

MYLONAS, C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 516–534, 2010.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, growth & differentiation**, v. 50, p. S195–S219, 2008.

OKUBO, K.; NAGAHAMA, Y. Structural and functional evolution of gonadotropin-

releasing hormone in vertebrates. **Acta Physiologica**, v. 193, n. 1, p. 3–15, 2008.

PEIXE-BR. Anuário da Piscicultura 2020. **Associação Brasileira de Piscicultura**, v. 1, p. 1–136, 2020.

PHAM, K. et al. Changes in brain and pituitary GnRH levels during ovarian maturation in wild female Japanese flounder. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 241–248, out. 2006a.

PHAM, K. X. et al. Distribution of three GnRHs in the brain and pituitary of the wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v. 72, n. 1, p. 89–94, fev. 2006b.

PHAM, K. X.; DAO, H. V.; AMANO, M. Changes in brain and pituitary GnRH levels during a reproductive cycle in wild female Asian sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Bloch, 1790). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 19, n. 6, p. 3255–3268, 2020.

POWELL, J. F. et al. Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. **Regulatory Peptides**, v. 68, n. 3, p. 189–195, 1997.

POWELL, J. F. F. et al. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. **Neurobiology**, v. 91, p. 12081–12085, 1994a.

PRESTON, J. C. Evo-Devo: Regulatory and Protein-Coding Evolution in Plant Diversification. **Encyclopedia of Evolutionary Biology**, p. 13–18, 14 abr. 2016.

ROCH, G. et al. GnRH receptors and peptides: skating backward. **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 209, p. 118–134, 2014.

SEFIDEH, F. A. et al. Local duplication of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor before two rounds of whole genome duplication and origin of the mammalian GnRH receptor. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 3 fev. 2014.

SELVARAJ, S. et al. Molecular characterization and expression profiles of three GnRH forms in the brain and pituitary of adult chub mackerel (*Scomber japonicus*) maintained in captivity. **Aquaculture**, v. 356, p. 200–210, 2012.

SENTHILKUMARAN, B. et al. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 3, p. 181–186, 1999.

SERVILI, A. et al. Climate change impacts on fish reproduction are mediated at multiple levels of the brain-pituitary-gonad axis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 291, 2020.

SILVA, J. A. M. DA; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVERIA-PEREIRA, M. I. D. Valor nutricional e energético de espécies vegetais importantes na alimentação do Tambaqui. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 4, p. 687–700, dez. 2003.

SOLIS-MURGAS, L. D. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 35, n. 2, p. 186–191, 2011.

SOMOZA, G. M. et al. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cII GnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). **General and Comparative Endocrinology**, v. 94, n. 1, p. 44–52, 1994.

TOSTIVINT, H. Evolution of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene family in relation to vertebrate tetraploidizations. **General and comparative endocrinology**, v. 170, n. 3, p. 575–581, 2011.

WOYNÁROVICH, A.; VAN ANROOY, R. Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). **FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper**, n. 624, p. 1–121, 2019.

YANG, B. et al. Goldfish kisspeptin: Molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 1, p. 60–71, 2010.

YARON, Z. et al. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 2–3, p. 489–502, 2001.

YARON, Z.; LEVAVI-SIVAN, B. Endocrine regulation of fish reproduction. **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**, v. 2, p. 1500–1508, 2011.

YU, K. L.; SHERWOOD, N. M.; PETER, R. E. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). **Peptides**, v. 9, n. 3, p. 625–630, 1988.

YUN, S. et al. Prevertebrate local gene duplication facilitated expansion of the neuropeptide GPCR superfamily. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 11, p. 2803–2817, 2015.

ZANIBONI-FILHO E. Priming hormone administration to induce spawning of some brazilian migratory fish. **Rev Bras Biol**, 1996; 56(4): 655-659.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, AP de O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt**, p. 45-73, 2004.

ZOHAR, Y. et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 438–455, 2010.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. In: **Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture**. Elsevier, p. 99-136, 2001.

